

ANTONIE VAN LEEUWENHOEK

NEDERLANDSCH TIJDSCHRIFT VOOR HYGIËNE, MICROBIOLOGIE EN SEROLOGIE

Orgaan van de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie



Onder redactie van Prof. Dr. W. C. DE GRAAFF, Hoogleeraar a. d. Rijksuniversiteit
te Utrecht en Dr. W. Aeg. TIMMERMAN, Directeur van het
Rijks Instituut voor de Volksgezondheid te Utrecht.

Vaste medewerkers: Prof. Dr. L. DE BLIECK (Utrecht), Prof. Ir. B. VAN DER BURG (Wageningen), J. P. BIJL (Utrecht), Dr. W. DOORENBOS (Alexandrië), Prof. Dr. P. C. FLU (Leiden), Dr. T. FOLPMERS (Rotterdam), Dr. J. A. VAN HASSELT (Amsterdam), Dr. J. VAN DER HOEDEN (Utrecht), Prof. G. KAPSENBERG (Groningen), Prof. A. KLEIN (Den Haag), Prof. Dr. A. J. KLUYVER (Delft), Prof. Dr. J. J. VAN LOGHEM (Amsterdam), Dr. P. A. MEERBURG (Bussum), Dr. S. L. SCHOUTEN (Utrecht), Prof. Dr. W. A. P. SCHÜFFNER (Amsterdam), Prof. Dr. J. SMIT (Wageningen), A. J. VITRINGA (Amsterdam), Prof. Dr. JOH^A WESTERDIJK (Baarn), Prof. L. K. WOLFF (Utrecht).

DEEL IV

N.V. SWETS EN ZEITLINGER

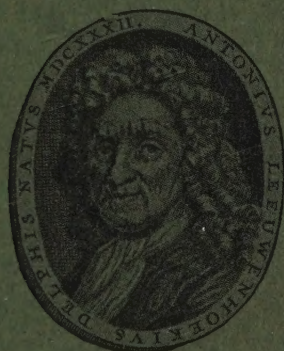
BOEKHANDEL EN UITGEVERSMAATSCHAPPIJ, AMSTERDAM

1937

ANTONIE VAN LEEUWENHOEK

NEDERLANDSCH TIJDSCHRIFT VOOR HYGIËNE, MICROBIOLOGIE EN SEROLOGIE

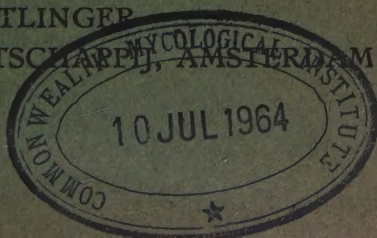
Orgaan van de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie



Onder redactie van Prof. Dr. W. C. DE GRAAFF, Hoogleeraar a. d. Rijksuniversiteit
te Utrecht en Dr. W. Aeg. TIMMERMAN, Directeur van het
Rijks Instituut voor de Volksgezondheid te Utrecht.

Vaste medewerkers: Prof. Dr. H. ALDERSHOFF (Utrecht), Prof. Dr. L. DE BIECK
(Utrecht), Prof. Ir. B. VAN DER BURG (Wageningen), J. P. BIJL (Utrecht), Dr. W.
DOORENBOS (Alexandrië), Prof. Dr. P. C. FLU (Leiden), Dr. T. FOLPMERS (Rotterdam),
Dr. J. A. VAN HASSELT (Amsterdam), Dr. J. VAN DER HOEDEN (Utrecht), Prof. G. KAPSENBERG
(Groningen), Prof. A. KLEIN (Den Haag), Prof. Dr. A. J. KLUYVER (Delft), Prof. Dr.
J. J. VAN LOGHEM (Amsterdam), Dr. P. A. MEERBURG (Bussum), Dr. S. L. SCHOUTEN
(Utrecht), Prof. Dr. W. A. P. SCHÜFFNER (Amsterdam), Prof. Dr. J. SMIT (Wageningen),
A. J. VITRINGA (Amsterdam), Prof. Dr. JOH^A WESTERDIJK (Baarn).
Prof. L. K. WOLFF (Utrecht).

N.V. SWETS EN ZEITLINGER
BOEKHANDEL EN UITGEVERSMAATSCHAPPIJ, AMSTERDAM



INHOUD.

	Blz.
1. W. DE BOER, IR. H. L. BOOGAERT, IR. L. N. S. HOMANS en IR. W. C. SMIT, In hoeverre kan de duurzaamheid van koelhuisboter worden beïnvloed door de verschillende wijzen van het zuren van de room en door het al of niet zouten van de boter	1
2. DR. M. SARDJITO, DR. A. MOCHTAR en R. WIRASMO, Een onderzoek van het water Rawa-Pening als badwater in verband met eventueele typhus, dysenterie en leptospirosis infectie	53
3. DR. IR. A. PH. WEBER Dr. es Sc., l'Influence des hormones cristallisées sur la croissance de certaines de levures	79
4. BOEKBESPREKING	110

In hoeverre kan de duurzaamheid van koelhuis-
boter worden beïnvloed door verschillende wijzen
van het zuren van de room en door het
al of niet zouten van de boter?

DOOR

Ir. H. L. BOOGAERT, Ir. L. N. S. HOMANS, Ir. W. C. SMIT
Laboratorium van de Coöperatieve Fabriek van Melkproducten te Bedum.
en W. DE BOER.

Nationale Coöp. Zuivelverkoopcentrale te Amsterdam, Afd. Tech. Dienst.

De Houdbaarheid van Koelhuisboter.

Het is reeds lang bekend, dat de lage temperatuur op zichzelf niet schadelijk is voor microörganismen. Wel worden door lage temperaturen de verschillende levensprocessen vertraagd en heeft de vermeerdering slechts langzaam plaats. De schadelijke werking voor de microörganismen van de lage temperaturen bij het bewaren van boter in koelhuizen moet dan ook niet in de eerste plaats aan de lage temperaturen, maar aan de omstandigheid worden toegeschreven, dat het vocht in de boter bij voldoende lage temperatuur bevroren is. Dit is natuurlijk bij ongezoeten boter al bij hooger temperatuur het geval dan bij gezouten boter. Het is daarom volgens sommigen (o a. Støren (1)) voldoende de boter zoo ver te koelen totdat het vocht in de boter bevroren is; bij een zoutgehalte van 1 % (watergehalte 15 %) is dit al bij -5°C het geval, bij een zoutgehalte van 2.5 % bij -12°C . Het zou dus voldoende zijn de boter tot -5° tot -8°C te koelen, veiliger is -10°C tot -12°C . Evenwel is het, vooral in Amerika, gebruikelijk veel lagere temperaturen te gebruiken, n.l. 0°F ($-17^{\circ}.8\text{C}$) of zelfs nog lager.

Over de invloed van lage temperaturen op de houdbaarheid

van boter bestaat geen eenstemmig oordeel. In het algemeen is men het er wel over eens dat de houdbaarheid bij lager temperatuur grooter is dan bij hooger temperatuur. Ook vinden de meeste onderzoekers, dat de houdbaarheid van minder sterk gezuurde boter grooter is dan die van de boter uit sterk gezuurde room (2) (3). De invloed van het zout is bij lagere concentraties gunstiger dan bij hogere concentraties en het is duidelijk, dat het zout een remmende invloed uitoefent op de ontwikkeling der microorganismen.

Verschillende onderzoekers kwamen tot de conclusie dat de achteruitgang in kwaliteit van de koelhuisboter niet zoozeer door de werking van bacteriën als wel door chemische processen wordt veroorzaakt (4) (5) (6).

Wat de activiteit der microorganismen bij lage temperatuur aangaat, geeft Porcher (7) de volgende vermeldingswaardige bijzonderheden: bij temperaturen tusschen -7°C en -12°C heeft nog een merkbare melkzuurgisting plaats. Bij temperaturen om het vriespunt zijn nog werkzaam bacteriën als *B. vulgare*, *B. fluorescens* en gisten met proteolytische en lipolytische eigenschappen.

De meer of minder lage temperatuur moet worden gekozen in verband met de tijd, gedurende welke de boter moet worden bewaard, bij lang bewaren moet dus dieper worden gekoeld. De boter van Mei kan tot de daaropvolgende maand Januari worden bewaard bij een temperatuur van $-7^{\circ}.8\text{C}$ tot $-6^{\circ}.7\text{C}$, mits de temperatuur niet meer varieert dan 2° , want het zouden juist de temperatuurswisselingen zijn, die de veranderingen in boter veroorzaken.

Het aantal bacteriën, dat de boter, die in een koelkelder is opgeslagen, bevat, is volstrekt niet altijd laag, het kan zelfs 15 millioen per gram bedragen. Is hiervan een groot percentage melkzuurbacteriën, dan behoeft dit geen reden tot ongerustheid te geven, daar deze geen schadelijke invloed uitoefenen op de kwaliteit van de boter. Schadelijker zijn de meeste andere bacteriën, zooals de vetsplitsers, die belangrijke veranderingen in de boter veroorzaken. De bacteriën van de coli-aerogenes-groep bewerken een onaangename smaak. De ranzigheid ontstaat door hydrolyse van de vetten. Dit heeft vooral plaats door bepaalde schimmels als *Oospora lactis*, *Cladosporium butyri*, *Penicillium glaucum*. *O. lactis* is hiervan wel de belangrijkste.

De geschiktheid van boter om bij lage temperatuur bewaard te worden, hangt minder van de temperatuur in de koelruimte, dan van de kwaliteit van de room, die voor de boterbereiding gebruikt is en de zorgvuldigheid van de boterbereiding af.

Door Knudsen (8) (8a) is naar een eenvoudige methode gezocht, waarmee kon worden bepaald in hoeverre de boter een grootere of kleinere houdbaarheid zou bezitten. Hij meent dit te hebben gevonden in het bepalen van het zgn. katalasegetal. Dit geeft aan het aantal $\text{cm}^3 \text{O}_2$, dat door de bepaalde hoeveelheid boter uit H_2O_2 wordt vrijgemaakt. Het is nml. gebleken, dat vrijwel uitsluitend de schadelijke bacteriën katalase bezitten, terwijl de melkzuurbacteriën katalasenegatief zijn. Het katalasecijfer is dus een maat voor het aantal schadelijke microorganismen. Knudsen vond dat als regel de beste boter een laag katalasecijfer, de slechte boter een hoog katalasecijfer bezat.

In tegenstelling met de ervaringen van Knudsen en Jensen komen andere onderzoekers tot de conclusie, dat het katalasegetal geen maat is voor de hoeveelheid ongewenste bacteriën in de boter, omdat ook melkzuurbacteriën het katalasecijfer kunnen verhoogen en zelfs geringe hoeveelheden keukenzout, terwijl de ongewenste bacteriën juist het katalasecijfer kunnen verlagen (9): Er bestaat geen correlatie tusschen katalasecijfer en de kwaliteit van de boter (10). Voor koelhuysboter is de katalasetest onbruikbaar (6), er bestaat geen verband tusschen verandering in kwaliteit tijdens „storage” en het katalasegetal. Maar volgens Cruess - Callaghan (11) moeten de resultaten van Knudsen en Jensen, zoowel als die van Demeter en Christiansen anders geïnterpreteerd worden, de correlatiecoëfficiënten van Knudsen zijn te hoog, van Demeter te laag.

Met behulp van de methode van Knudsen is nu ook uit te maken of bepaalde botergebreken door bacteriën worden veroorzaakt of van chemische aard zijn. De zure boter heeft een hoog katalasecijfer, en bevat dus veel vreemde, d.w.z. schadelijke microorganismen. Talkige en olieachtige (vettige) boter heeft daarentegen een laag katalasecijfer en bevat dus weinig vreemde microorganismen. Bij deze laatste gebreken heeft men dus met chemische oorzaken te doen. De chemische veranderingen komen vooral op de voorgrond bij gezouten boter van gezuurde room, terwijl de fouten door bacteriënwerking vooral ontstaan bij zoetgekarnde room (12). De chemische veranderingen worden

sterk bevorderd door het melkzuur en door metaalzouten (13).

Van veel belang zijn de onderzoekingen over de invloed van het gebruik van zgn. *inerte gassen* tijdens het karnen en tijdens het bewaren in de koelruimte (14). Hierbij werd gevonden dat de houdbaarheid bij gebruik van stikstof of waterstof bij het bewaren bij lage temperatuur sterk toeneemt en wel drie maal zoo groot is als bij karnen en bewaren in lucht. Bij hogere temperaturen dan 0°C . is de gunstige invloed van deze gassen evenwel geringer. Eenzelfde boter kan bij $5^{\circ}\text{--}6^{\circ}\text{C}$ in stikstof evenlang worden bewaard als in lucht bij 0°C . Bij lang bewaren zijn lage temperaturen noodzakelijk.

De invloed van het zout op de ontwikkeling der micro-organismen is de volgende (15): in 't algemeen zijn de gram-negatieve bacteriën zeer resistent tegen hoge zoutconcentraties, terwijl de grampositieve gevoeliger zijn. Micrococcen kunnen 6—10 % NaCl verdragen. Voor *B. coli* is 5 % NaCl reeds dodelijk. De melkzuurbacteriën groeien niet meer bij 10,5 % NaCl. (16), onder gunstige omstandigheden groeien ze nog bij een concentratie van 6 % NaCl. Staphylococcen zijn ongevoelig voor zout. De schimmelgroei houdt op bij 14 - 16 % NaCl. Gisten zijn zeer zouttolerant, zij kunnen wel 24 % zout verdragen. Bij 4—5 % zout-concentratie groeien de meeste goede melkzuurbacteriën al niet meer, terwijl de ongewenste bacteriën zich nog wel ontwikkelen en er dus bederf intreedt. De minder sterk gezouten boter blijft het best. In sterk gezouten boter blijft het vocht lang vloeibaar, waardoor nog groei van zout-tolerante organismen kan plaats hebben. Er zijn bacteriën die zich nog bij een concentratie van 30 % zout kunnen ontwikkelen (17), maar de meeste bacteriën verdragen in reïncultuur niet meer dan 6 % NaCl. Boterzuurbacteriën en proteolytische bacteriën kunnen nog wel leven in 24 % NaCl. Bij een vochtgehalte in de boter van 15 % en een zoutgehalte van 1 % zal de concentratie van het zout in het vocht 15 % bedragen. Het zal dus heelemaal van de aard der microorganismen afhangen, welke ervan op den duur in deze pekkel blijven leven. De melkzuurbacteriën zullen waarschijnlijk wel in aantal afnemen. De zouttolerantie van de lipolytische bacteriën is ook niet hoog en overtreft als regel niet de 6 % (18). Een vergelijkende studie over de groei van gisten, schimmels en bacteriën bij gezouten en ongezouten boter in een koelruimte is verricht door Macy

(19). Hij vond dat het aantal gisten bij de ongezoeten boter iets meer toenam dan bij gezouten boter. De schimmels namen in de ongezoeten boter sterker toe dan in de gezouten boter. Het aantal bacteriën nam bij de ongezoeten boter veel sterker toe dan bij de gezouten boter. De gisten zijn dus het minst gevoelig voor zout. Ook de lage zoutconcentraties hebben al een duidelijk remmende invloed. Andere onderzoekers (20) vonden dat de ongezoeten boter twee maal zooveel bacteriën bevatte als de gezouten boter. Bij boter, die bij lage temperatuur was bewaard nam het aantal bacteriën toe bij de ongezoeten boter, maar af bij de gezouten boter, wanneer de boter weer op kamertemperatuur werd gebracht.

Bij afwezigheid van andere factoren van bederf schijnt er een correlatie te bestaan tusschen het aantal vetsplitsende en caseïnesplitsende bacteriën en het bederf van de boter, bij temperaturen, waarbij deze bacteriën kunnen groeien. Voor het bederf zijn de perioden vóór het brengen in de koelruimte en de periode na het opslaan van meer belang dan de periode van bewaren bij lage temperaturen. Gebleken is verder, dat de boter met de beste houdbaarheid was gemaakt van zoete, gepasteuriseerde room en ongezoeten (21). Zijn er weinig micro-organismen of is de temperatuur te laag voor hun ontwikkeling, dan versnelt zout en ook zuur het chemisch bederf van de boter. Zijn er veel micro-organismen en is de temperatuur voor hun ontwikkeling gunstig, dan hebben zout en zuur een conserveerende werking in de boter.

Wat de *invloed van de lage temperaturen* op de micro-organismen aangaat, kan het volgende worden vermeld.

Arup en van B. Gilmour (22) vonden dat bij -2°C er een geringe afneming was in het aantal gisten, bij -6°C en -12°C was deze vermindering sterker. Bij -2°C en -6°C nam het aantal schimmels nog iets toe, bij -12°C nam het af. Het aantal bacteriën verminderde zoowel bij -2°C , als bij -6°C als bij -12°C . Zij vonden geen correlatie tusschen de rijkdom aan gisten, schimmels en bacteriën en de houdbaarheid. Verder bleek dat zure boter ($\text{pH} < 6.7$) minder goed houdbaar was dan de boter met hooger pH.

Het aantal bacteriën van de coli-aerogenesgroep gaat bij bewaren bij lage temperatuur achteruit of verdwijnt geheel (23) (24).

Door Berry en Magoon (25) is nagegaan de invloed van temperaturen beneden 0°C op de ontwikkeling van reinculturen van microorganismen. Zij vonden dat in 't algemeen bij en beneden 0°C de schimmels beter groeien dan de bacteriën (zie ook S. Orla-Jensen and N. C. Otte, 1. c. (13)). Nog bij $\pm -8^{\circ}\text{C}$ heeft sporevorming van schimmels plaats. Beneden -5°C groeien nog *Cladosporium* en *Sporotrichum*, bij -4°C groeien nog *Penicillium* en *Monilia*, gisten als *Torula*'s en bacteriën als *Pseudomonas fluorescens* en *Lactobacillus*. Beneden -10°C heeft waarschijnlijk geen groei van microben meer plaats. Niet de koude in de eerst plaats werkt schadelijk, maar eerder de ijsvorming, hoewel sommige schimmels voor ijsvorming ongevoelig zijn.

Orla-Jensen en Otto (l.c.) vonden dat bij -30°C na een jaar nog microbacteriën en micrococcen in leven waren gebleven. Cryophile organismen werden door hen niet aangetroffen. Bij temperaturen tusschen $-3^{\circ}.5\text{C}$ en $7^{\circ}.5\text{C}$ nam het aantal microorganismen snel af. Niet alleen wordt bij deze lage temperaturen de ontwikkeling van schadelijke microorganismen geremd, maar ook de werking van hun enzymen.

Bij afwezigheid van lucht kan bij lage temperatuur de boter zeer lang (270 dagen) worden bewaard, zonder dat de kwaliteit vermindert (26).

Over de invloed van de lage temperatuur op het aroma van de boter is door Barnicoat een onderzoek verricht (27). Bij -10°C tot $-8^{\circ}.3\text{C}$ had bij bewaren gedurende 6 maanden weinig verandering plaats in het diacetylgehalte van de boter. Extra toegevoegd diacetyl verdween echter grootendeels en werd gereduceerd tot acetylmethylcarbinol.

Verscheidene onderzoekers vinden dat er geen samenhang bestaat tusschen het aantal microorganismen en de houdbaarheid of de kwaliteit van de boter (28) (6). De boter veranderde bij -6°C gedurende 6 maanden weinig. Volgens Rahn (29) zou de kans op een goede houdbaarheid evenwel grooter zijn naarmate het aantal microorganismen kleiner zou zijn.

Volgens Rogers c.s. zou boter in „cold storage” zelfs bij zeer lage temperaturen nog duidelijke veranderingen ondergaan. Deze veranderingen zouden duidelijker zijn naarmate de room, waarvan de boter gemaakt was, zuurder was.

Grimes (30) vond dat de invloed van de gisten en schimmels

gedurende bewaren bij zeer lage temperatuur ($-21^{\circ}.1\text{ C}$) gering was, beide gingen grootendeels dood. Een aantal bacteriën overleven het verblijf bij deze lage temperatuur, nl. *Sc. lactis*, zuurvormende, niet-stremmende bacteriën en gele micrococcen, terwijl ook *Sc. paracitrovorus* meestal nog wordt aangetroffen. Van de oorspronkelijke boterflora van gezuurde room blijft $\pm 2\%$ leven. De boter van zoete room bevat na het opslaan bij lage temperatuur dikwijls meer bacteriën dan ervoor, maar gemiddeld sterft 20% van het oorspronkelijk aantal bacteriën. De voornaamste factor voor de houdbaarheid is volgens hem de kwaliteit van den room vóór het karnen.

Hammer and Collins bestudeerden den invloed van de vetsplitsende bacteriën (31). De ranzigheid gaat meestal samen met een hoog gehalte aan lipolytische bacteriën. Deze bacteriën groeien als regel beter in de oppervlaktelaag dan verder naar binnen. De zouttolerantie is verschillend, maar als regel niet hooger dan $\pm 6\%$.

Ranzigheid wordt door de volgende microörganismen veroorzaakt: *O. lactis*, verschillende gisten. *B. fluorescens*, *B. prodigiosum*, *Cladosporium butyri*. Een kaassmaak door melkzuurbacteriën en gisten.

Zoals reeds werd opgemerkt (blz. 5) is voor een goede houdbaarheid een niet hooge zuurgraad gewenscht. Deze moet liggen tusschen $\text{pH } 5.0$ en $\text{pH } 6.0$ (32). Volgens Grimes (33) is voor gerijpte room een zuurgraad van 0.40% ($= 40^{\circ}\text{ D.}$) gunstig (bij een vetgehalte van 35%), zelfs bij een zuurgraad van 0.60% ($= 60^{\circ}\text{ D.}$) is de houdbaarheid bij bewaren in koelruimte voldoende. Het is voor de houdbaarheid onverschillig of bij den gepasteuriseerden room 10% zuursel wordt gevoegd zonder rijpen of heelemaal geen zuursel.

Doel en opzet van het onderzoek.

Het onderzoek had ten doel na te gaan in hoeverre de houdbaarheid van de koelhuisboter kan worden beïnvloed door verschillende wijzen van het zuren van den room gecombineerd met het al of niet zouten van de eruit bereide boter; en een verband te vinden tusschen de veranderingen in de microflora van de boter, de chemische en physische grootheden en de

uitslagen van de keuringen tijdens het bewaren in den koelkelder en in den boterkelder.

Dit gedeelte van het verslag zal zich alleen bepalen tot het bacteriologisch onderzoek van de boter.

Daartoe werden een aantal verschillende botersoorten gedurende 4 maanden in den koelkelder van de Coöperatieve Fabriek van Melkproducten te Bedum bewaard bij een temperatuur van -7° tot -9° C.

De boter werd onderzocht:

- a) versch;
- b) na 2 à 3 weken bewaren in den boterkelder;
- c) na 2 maanden in den koelkelder;
- d) na 2 maanden in den koelkelder, gevolgd door 9 dagen in den boterkelder.
- e) na 4 maanden in den koelkelder.
- f) na 4 maanden in den koelkelder en 2 dagen in den boterkelder;
- g) na 4 maanden in den koelkelder en 16 dagen in den boterkelder;

De keuringen op reuk en smaak hadden plaats:

- 1) na 1 en 2 weken bewaren in den boterkelder; (vgl. b).
- 2) na 2 maanden in den koelkelder; (vgl. c).
- 3) na 4 maanden in den koelkelder en 2 dagen in den boterkelder; (vgl. f).
- 4) na 4 maanden in den koelkelder en 16 dagen in den boterkelder; (vgl. g).

Voor het bacteriologisch onderzoek werden voor proeven c) tot en met e) stukken boter gebruikt van ± 5 kg., verpakt in perkamentpapier, voor de twee laatste werden monsters genomen uit kleine botervaatjes. De keuringen 1) en 2) hadden plaats van andere stukken boter ¹⁾, dan de stukken welke voor het bacteriologisch onderzoek werden gebruikt, voor de laatste twee keuringen werden dezelfde vaatjes gebruikt als waaruit de bacteriologische monsters werden genomen.

De monsters voor het bacteriologisch onderzoek werden

¹⁾ Keuring 1) had in Amsterdam plaats, waarvoor in vaatjes daarheen gezonden boter werd gebruikt.

genomen door met een steriele spatel van V₂A staal eerst de buitenkant van het deel boter waaruit het monster werd gehaald, af te schrappen en daarna een steriel wijdmondsch fleschje met ingeslepen stop te vullen met de te onderzoeken boter; er werd als regel 40-60 gram boter per monster gebruikt. Deze boter werd in een waterbad van $\pm 45^{\circ}$ C gesmolten, goed geschud en met steriele, even voorgewarmde pipetten werden bepaalde hoeveelheden uit het fleschje genomen. Was er voor een bepaald onderzoek minder dan $\frac{1}{20}$ cc. boter nodig, dan werd 1 cc. boter gebracht in 99 cc. lauw steriel water en door stevig schudden daarin gesuspenderd. Met behulp van deze suspensie werden de benodigde hoeveelheden van 0.01 en 0.001 cc. verkregen. Was er 0.0001 cc. boter nodig dan werd eerst de suspensie nogmaals 100 maal verdund in water.

Bij dit onderzoek werden voor de verschillende groepen van microörganismen verschillende voedingsbodems gebruikt, nl.

- 1) brilliant - green - lactose - bile van Difco voor de *coli-aerogenes*groep;
- 2) mout - agar voor *gisten* en *schimmels*;
- 3) chinablauw - lactose - agar voor *melkzuurbacteriën*;
- 4) caseïne - agar voor *eiwitsplitsende organismen*;
- 5) chinablauw-water-agar voor *vetsplitsende organismen*;
- 6) bacto - trypton - glucose - agar en
- 7) proteose - pepton - glucose - agar met voedingszouten en 3 % keukenzout voor verschillende groepen organismen.

De voedingsbodems vermeld onder de nos. 2 t/m 5 worden in de literatuur aanbevolen voor het onderzoek op de genoemde bacteriën-groepen. De voedingsbodems no. 6 en 7 werden door ons in gebruik genomen, om te zien of de nieuwe Difco-media ook voor diverse bacteriën-soorten geschikt zouden kunnen zijn.

In de laatste tijd is bekend geworden dat bij het onderzoek van melk de toevoeging van een kleine hoeveelheid gesteriliseerde ondermelk aan sommige voedingsbodems het aantal telbare koloniën belangrijk doet toenemen. Om te zien of dit bij het boteronderzoek ook het geval was, werd de toevoeging van ondermelk (een hoeveelheid van 0.5 cc. per telplaat) ook toegepast bij de china-blauw-lactose-agar, de bacto-trypton-glucose-agar en de zoute proteose-pepton-glucose-agar. Slechts bij

het onderzoek van de versche boter werden er nog niet altijd platen met ondermelk gebruikt.

Bespreking en toepassing van de gebruikte voedingsbodems.

1. Brilliant-green-lactose-bile werd in gedestilleerd water opgelost tot de door Difco aangegeven sterkten en na sterilisatie in Einhorns gebracht, waarna de boter werd toegevoegd in hoeveelheden van 10 cc, 0.1 cc, 0.01 en 0.001 cc voor zoover dit tenminste noodig werd geacht. De Einhorns werden uiterlijk 2 dagen gecultiveerd bij 37° C. Eventueel in de boter aanwezige coli-aerogenes bacteriën manifesteren zich door gasvorming in de Einhorn. De contrôle op de aanwezigheid van de ware coli-bacteriën had plaats door uit de betreffende Einhorns af te strijken op een eosine-methyleen-blauw-plaat, waarop de koloniën van de coli-bacteriën groeien met een karakteristieke, sterke metaalglans.

2. Mout-agar wordt in het laboratorium te Bedum bereid met een pH van ± 6 , daar bij een lagere pH de agar bij het steriliseeren te week wordt. Vlak voor het gieten van de platen wordt per telplaat zooveel van een verdunde steriele melkzuuroplossing toegevoegd dat de eind pH van de agar 3.5 à 4 wordt. Bij deze pH komen alleen nog gisten en schimmels op. De te onderzoeken boter werd óf in de agar gesuspenderd (bij onderzoek van 1 of 0.5 cc boter) óf op de mout-agar plaat afgestreken (bij onderzoek van minder dan 0.5 cc boter).

3. China blauw-lactose agar werd bereid door 0.5 % pepton en 2 % lactose op te lossen in gedestilleerd water en hieraan 1½ % agar toe te voegen. Na oplossen van de agar en filtreren werd zooveel van een china blauw-lactose oplossing toegevoegd tot de agar helder blauw was. Deze voedingsbodem is niet selectief, er komen velerlei soorten bacteriën in tot ontwikkeling, maar de melkzuurbacteriën zijn als regel gemakkelijk te herkennen omdat de koloniën kleine, door de zuurvorming donkerblauwe koloniën zijn. Andere zuurvormers vormen grootere, lichtblauwe koloniën, terwijl die der niet-zuurvormers ongekleurd zijn of de zwak blauwe kleur van het medium aannemen. Deze voedingsbodem kan dus behalve voor het tellen der melkzuurbacteriën ook dienen voor het vaststellen van het totaal aantal in de

boter aanwezige bacteriën. (Soms kwam het voor, dat de blauwe kleur van de plaat geheel verdwenen was, waarschijnlijk een gevolg van de aanwezigheid van kolonies van sterk reducerende bacteriën).

4. Caseïne agar werd als volgt bereid ³⁾:

3.5 gram caseïne (van Hammarsten) wordt met een weinig gedestilleerd water in een mortier goed geroerd tot een papje, zoodat er geen droge klontjes in overblijven. Dan worden bij kleine beetjes en onder voortdurend roeren 72 cc verzadigd kalkwater toegevoegd, waardoor de caseïne oplost. Aan deze oplossing worden nog toegevoegd 0.35 gram kaliumcitraat en 0.1 gram Liebigvleeschextract. Het geheel wordt nu met gedestilleerd water aangevuld tot 300 cc waarna nog worden toegevoegd 100 cc van een 0.15 % calciumchloride oplossing en 100 cc van een fosphaatoplossing volgens Sörensen. (d.i. een oplossing van 0.105 % $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 0.035 % KH_2PO_4 .) 15 min. steriliseeren bij 120° C.

Apart van deze caseïne oplossing wordt gesteriliseerd een 3 % agar oplossing in gedestilleerd water. Voor het gebruik van de agar worden gelijke hoeveelheden caseïne oplossing en agar gemengd en in de petrischalen gegoten.

De caseïne agar plaat is melkachtig troebel en de eiwit-splitsters zijn er gemakkelijk op te herkennen doordat zich om de koloniën een grootere of kleinere doorschijnende hof vormt, bijna steeds cirkelvormig en vaak zeer duidelijk en scherp begrensd.

Er mogen niet te veel eiwitplitsende bacteriën op de plaat voorkomen, daar er anders geheel opgehelderde velden ontstaan en de eiwit-splitsters niet meer van de andere daarin voorkomende koloniën zijn te onderscheiden.

Melkzuurbacteriën komen op deze voedingsbodem niet tot ontwikkeling, zoodat dit medium goed gebruikt kan worden om het totaal aantal niet-melkzuurbacteriën in de boter te weten te komen.

³⁾ Dit recept werd hoofdzakelijk ontleend aan het voorschrift van Frazier en Rupp, zie bv. *Milchwirtschaft von A bis Z*, 94, (1935). Daar wij echter op deze wijze de caseïne niet in oplossing konden brengen werd een bereidings-wijziging ingevoerd beschreven door Porcher in *Le Lait* 9, 962 (1929).

5. China-blauw-water-agar bestaat uit een oplossing van $\frac{1}{2}$ % pepton in gedestilleerd water + $1\frac{1}{2}$ % agar en chinablauw⁴⁾. Om de vetaantasting door bacteriën te bewijzen moet er dan nog botervet in de plaat aanwezig zijn. Bij ons onderzoek werd dit vet toegevoegd in den vorm van de te onderzoeken boter zelf. Omdat deze boter nl. steeds geen of slechts zeer weinig vetsplitsende bacteriën bevatte werd steeds per plaat 1 cc ervan onderzocht en deze hoeveelheid botervet werd voldoende geacht als voedingsbestanddeel voor de eventueel aanwezige vetsplitters. De laatste vormen donkerblauwe koloniën, daar de door hen geproduceerde vetzuren op de indicator inwerken.

6. Bacto-trypton agar is een oplossing van 1 % bacto-trypton en 2 % glucose in leidingwater met $1\frac{1}{2}$ % agar en 0.003 % broom cresol purper. Deze indicator wordt toegevoegd om zoo noodig zuurvormers van niet-zuurvormers te kunnen onderscheiden. Dit medium bleek vaak een uitstekende voedingsbodem te zijn voor de verschillende microörganismen in de boter, waardoor hiermede dikwijls de hoogste totale aantallen bacteriën werden gevonden. Eveneens was dit het geval met

7. Proteose-pepton-agar, d.i. een oplossing van 1 % proteose pepton in leidingwater waaraan is toegevoegd 2 % glucose, een kleine hoeveelheid van enkele voedingszouten⁵⁾, 3 % keukenzout en broom cresol purper.

Tenslotte werd de boter zelf nog als voedingsbodem gebruikt door 20 cc ervan in een petrischaal te gieten, waarbij soms verkleuringen zichtbaar werden of groei van schimmels plaats had.

Alle platen werden gedurende 5 à 6 dagen bij 25° C gecultiveerd. In totaal werden voor al deze proeven ongeveer 2050 telplaten en 570 gistingsproefjes (Einhorns) ingezet.

Resultaten van het bacteriologisch onderzoek.

Alle aantallen bacteriën zijn opgegeven per cc boter.

De verkregen uitkomsten werden in een aantal *tabellen*

⁴⁾ Zie Fleischmann-Weigmann's Lehrbuch der Milchwirtschaft 7 te Aufl., 470 (1932). Volgens latere aanwijzingen van Henneberg moet nog $\frac{1}{2}$ % pepton worden toegevoegd, vgl. bv. Demeter, Bakteriologische Untersuchungsmethoden von Milch u.s.w. 1934, p. 72.

⁵⁾ d.z. 0.2 % $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ en 0.2 % MgSO_4 .

TABEL I. Gegevens betreffende de Bereiding.

1936		ongezouten		ongezouten		ongezouten		ongezouten		gezouten		gezouten			
		zoet	gezuurd	zoet	gezuurd	zoet	gezuurd	zoet	gezuurd	zoet	gezuurd	zoet	gezuurd		
No. Proef		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Datum		30 Juli	6 Aug.	19 Aug.	19 Aug.	19/20 Aug.	20 Aug.	20 Aug.	20/21 Aug.	27 Aug.	27 Aug.	27/28 Aug.	28 Aug.	28 Aug.	28/29 Aug.
Herkomst melk		ontv. stations	stations	ontvangstations	ontvangstations	ontvangstations	ontvangstations	ontvangstations	ontvangstations	ontvangstations	ontvangstations	ontvangstations	ontvangstations	ontvangstations	ontvangstations
Pasteurisatie-temp. °C		90—92	90—92	90—92	90—92	90—92	90—92	90—92	90—92	90—92	90—92	90—92	90—92	90—92	90—92
Gekoeld v/t aank. bassin . . .		7—9	7—9	6—7	6—7	6—7	6—7	6—7	6—7	6—7	6—7	6—7	7—8	7—8	7—8
Zuursel toegevoegd %		45	6.7	10	5	6.8	2	1	7.4	10	5	7.1	2	1	7.3
Laten staan tot karnen min.		45+75	22 uren	direct gekarnd	direct gekarnd	22 uren	direct	direct	20½ uur	direct	direct	20½ uur	direct	direct	21 uur
No. karn		2	2	2	3	2	2	3	2	1	2	2	1	2	2
Beginntemp. karnen		11	(13)8	9	9½	13+	9+	9½	13—	9+	9+	13	9½	9¾	13
Eindtemp. "		14	11¼	12½	12½	15¼	12+	12	15½	13	13	16—	13—	13—	15½
Duur karnen min.		27	200	37	29	37	33	28	32	30	35	58	29	37	40
Vegegh. Room + Zuursel		36.2	23	20.9	22.2	21.2	24.1	24.6	21.7	22	22½	21.7	23.3	24.1	21.7
" Karnemelk		0.77	0.42	1.10	1	0.47	1.35	1.20	0.45	1.30	1.10	0.52	1.60	1.40	0.50
Zhgr. Room begin karnen °D		34	54	22½	17½	57	15	13	55	21	17	56	15	14	55
" Karnemelk °D		44	—	25½	20½	64	17	15	64	23	19½	63	18	16	62
Temp. waschwater °C		9—8	9—8	9½—8	9½—8	9½—8	9—8	9—8	9½—8	9—8	9—8	8½—8½	9½—8½	9½—8½	9½—8½
Duur kneden min., (1 omw. /min.)		25	23	28	26	26	25	22	23	24	28	26	26	28	28
Eindtemp. boter				10½	10½	10½	10	10+	10+	10½	10½	11—	11—	11—	11—

Opmerkingen :
 voór het
 karnen
 140 kg. ijs
 toegevoegd.

TABEL I (vervolg). Gegevens betreffende de Bereiding.

1936	ongezouten			ongezouten			gezouten			gezouten		
	zoet	zoet	gezuurd	zoet	zoet	gezuurd	zoet	zoet	gezuurd	zoet	zoet	gezuurd
No. Proef	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Datum	2 Sept.	2 Sept.	2/3 Sept.	3 Sept.	3 Sept.	3/4 Sept.	9 Sept.	9 Sept.	9/10 Sept.	10 Sept.	10 Sept.	10/11 Sept.
Herkomst melk	ontvangstations	ontvangstations	ontvangstations	ontvangstations	ontvangstations	ontvangstations	ontvangstations	ontvangstations	ontvangstations	ontvangstations	ontvangstations	ontvangstations
Pasteurisatie-temp. °C . . .	90—92	90—92	90—92	90—92	90—92	90—92	90—92	90—92	90—92	90—92	90—92	90—92
Gekoeld v/t aank. bassin .	6½—8	6½—8	6½—8	7—8	7—8	7—8	6—7	6—7	6—7	6½—7½	6½—7½	6½—7½
Zuursel toegevoegd ⅓, aan laatste waschwater . . .	½	1	(7.1)	2½	5	(7.4)	½	1	(7.8)	2½	5	(7.6)
Laten staan tot karnen min.	direct	direct	20½ uur	direct	direct	22 uur	direct	direct	21½ uur	direct	direct	20½ uur
No. karn	1	2	2	1	2	2	2	1	3	1	2	2
Beginntemp. karnen	9¼	9¼	13	9½	9¾	13½	9	9	12¾/4	9+	9¼	12½
Eindtemp. "	12½	12½	15½	13—	13—	15½	12	12	15	12+	12+	15
Duur karnen min.	34	41	46	30	34	38	27	32	30	35	38	44
Vetgeh. Room + Zuursel .	21.7	22.2	22.5	24.1	24.1	22	25.6	25.9	21.7	23.5	23.5	22.5
" Karnemelk	1.15	1.10	0.57	1.40	1.25	0.37	1.60	1.35	0.40	1.35	1.20	0.47
Zhgr. Room begin karnen °D	—	—	55	—	—	57	—	—	56	—	—	55
" Karnemelk °D	—	—	65	—	—	67	—	—	63	—	—	62
Temp. waschwater °C . . .	9½—8½	9½—8½	8½—7½	9½—8½	9½—8½	9½—8½	9½—8½	9½—8½	9½—8½	9½—8½	9½—8½	9½—8½
Duur kneden min., (1 omw. /min.)	22	30	28	27	29	31	33	30	27	27	28	26
Eindtemp. boter	11—	11—	11	11—	11—	11+	11+	11+	11	11+	11+	11

No. Proef	zoet of normaal	gez. of ongez.	toege- voegd %	zuursel	%	vocht	%	zout	%	eiwit	mg. p. kg. ijzer	Jood- additie- getal	bewaard in :		carbinol + diacetyl in 500 gr. boter				
													boter- kelder	koel- kelder	versch	na 1 week	na 2 weken	na 3 weken	na 4 weken
1 (1a)	zoet contrôle norm.	0	45 b)		14.85	0.56	0.7	45.1	135	140	((+)) c)	(+)							
2 (2a)					14.8	0.38	1.4	45.5	125	124	+ a)	((+))							
3	zoet contrôle	0	10		14.7	0.63	0.8	46.6	101	110	—	+							
4					14.65	0.49	1.—	45.6	111	121									
5	zoet norm.	0	5		14.6	0.40	0.8	46.6	163	137	—	—							
6					15.4	0.29	1.—	46.8	161	131	—								
7	zoet norm.	0	2		14.7	0.42	2.2	46.5	135	123	+	—							
8					15.2	0.32	2.6	46.9	148	134	—								
9	zoet norm.	g	1		15.1	0.34	0.9	46.8	178	143	—	—							
10					14.5	0.47	2.2	47.—	145	121	+	+							(+)
11	zoet norm.	g	10		14.5	0.96	2.6	47.3	150	124	((+))	(+)							
12					13.8	0.65	2.3	46.8	149	126	—	—							
13	zoet norm.	g	5		15.—	0.66	2.—	47.1	147	116	+	+							
14					13.9	0.95	2.6	47.—	188	127	—	—							
15	zoet norm.	0	1	wasch- water	14.85	0.32	1.2	47.2	160	130	—	—							
16					14.1	0.49	0.8	47.3	108	100	+	+							
17	zoet norm.	0	1		15.—	0.37	1.4	47.3	160	141	—	—							
18					14.5	0.35	0.9	47.6	160	143	—	—							
19	zoet norm.	0	2½		13.9	0.53	0.7	47.2	155	134	+	—							
20					15.5	0.39	0.7	47.4	176	144	((+))								
21	zoet norm.	g	5		15.2	0.44	1.2	47.4	171	112	((+))	(+)							
22					15.3	0.44	0.8	47.1	137	117	+	+							(+)
23	zoet norm.	g	1		15.5	1.04	1.5	48.4	145	128	—	—							
24					15.4	0.87	0.7	48.6	140	126	—	—							
25	zoet norm.	g	2½		14.75	0.84	1.8	48.5	109	104	+	+							
26					14.7	0.95	1.4	48.6	126	120	—	—							
					14.75	0.62	1.8	49.1	124	127	—	—							
					15.4	0.97	0.8	48.8	116	127	+	+							

a) Stevigheid = aantal grammen noodig ter verplaatsing van 1 gram boter in het penetratie-toestel van Perkins (telkens bepaald bij nauwkeurig 15° C. en steeds met dezelfde naald).

b) In 50 cc. zuursel werden gevonden: acetylmethylcarbinol + diacetyl: + + + (+); diacetyl: ((+)).

c) diacetyl: (((+)))

No. Proef	zoet of normaal	gez. of ongez.	zuursel toege- voegd %	1e keuring			2e keuring			3e keuring		
				oud dgn.	beoordeeling: (koud gekeurd)	oud dgn.	klasse	1e beoordeeling:		oud dgn.	klasse	beoordeeling:
								4 à 5 maanden in de koelkelder + 2 dagen in de boterkelder				
1 (1a)	zoet contrôle norm.	0	45	109	goed	159	I	goed, iets vetting	173	II	vetting	
2 (2a)				102	iets kooksmaak	152	II à III	vetting, sterk	166	II	vetting, iets goor	
3	zoet zoet norm.	0	10	89	goed	139	I	goed?	153	I	goed	
4				89	goed	139	I	zeer goed, normale boter	153	I	zeer goed	
5	zoet zoet norm.	0	2	88	goed	138	II	vetting	152	II à III	vetting	
6				88	goed	136	I	goed, iet kooksmaak?	152	I	goed	
7	zoet zoet norm.	0	1	88	goed	136	I	goed, normaal	152	I à II	goed, iets goor	
8				87	goed	135	II	vetting	151	II	vetting	
9	zoet zoet norm.	g	10	81	iets afwijkend	131	I	goed	145	I à II	iets bijsmaakje	
10				81	iets afwijkend	131	I	goed, iets bijsmaak	145	I à II	bijsmaak	
11	zoet zoet norm.	g	5	80	ietsje vetting	130	II à III	vetting	144	III	spekkig	
12				80	goed	130	I	goed	144	I	goed	
13	zoet zoet norm.	g	2	80	goed	130	I	goed	144	I	goed	
14				79	ietsje vetting	129	III	vetting	143	II à III	vetting	
15	zoet zoet norm.	0	waschwater	75	goed	126	I	goed	139	I	goed	
16				75	goed	125	I	zeer goed	139	I	goed, iets minder dan 15	
17	zoet zoet norm.	0	1	74	goed	124	II	vetting	138	II à III	vetting	
18				74	goed	124	I	iets afwijkend?	138	I	goed (??)	
19	zoet zoet norm.	0	2½	74	iets afwijkend	124	I à II	afwijkend	138	I	zeer goed	
20				73	iets afwijkend	123	II	vetting	137	II	vetting	
21	zoet zoet norm.	g	1	68	goed	118	I	goed	132	I	goed	
22				68	goed	118	I	goed	132	I	goed	
23	zoet zoet norm.	g	1	67	ietsje vetting	117	II	vetting	131	III	spekkig	
24				67	goed	117	I	goed (erg zout)	131	I	goed	
25	zoet zoet norm.	g	2½	67	iets afwijkend	117	I	goed?	131	I	goed	
26				66	ietsje vetting	116	II à III	vetting	130	III à IV	spekkig	

n No. 1	2	3	4	
---------	---	---	---	--

karnen, zuursel toe te voegen (contrôle karns gewoon aangezuurd).

Chinablauw-lactose agar				Caseïne agar		Chinablauw water agar + vet aantal vetplitsende bacteriën	Plaat van 20 cc uitgegoten boter	Keuringen		
er ondermelk bacteriën	aantal niet melkzuur- bacteriën	met 0.5 cc ondermelk per plaat aantal melkzuur- bacteriën	aantal niet melkzuur- bacteriën	totaal aantal bacteriën	aantal eiwitplitsende bacteriën			oud dagen	reuk en smaak	Opmerking
1000	>11.400	4.000	>11 300	1.900	900	1?	13 schimmels			
1000	700	2.000	700	221.000	16.000	0	0	15	iets goor	
1000	196.000	46.000	670.000	280.000	90.000	0	5 "	89	goed	
1000	1.600	5.000	1.400	8.100	500	0	13 "			
1000	3.900	<100	5.200	4.500	600	0	0 "	139	goed?	lekker
1000	zeer veel	15.000	± 3.000.000	± 6.000.000	veel	0	12 "	153	goed	
1000	>2.300	3.800	>6.000	400	100	2?	6 schimmels			
1000	8.000	200	3.800	45.000	1.000	0	0	15	iets goor	
1000	1.440.000	42.000	1.280.000	1.700	900	0	2 "	89	goed	
1000	—	—	—	840.000	? veel	0	0			
1000	4.000	3.000	5.000	2.900	400	—	—			
1000	1.000	<100	900	4.600	200	0	0			
1000	564.000	4.800	712.000	1.180.000	700	300	3	139	zeer goed	
1000	—	—	—	veel	veel	0	0	153	zeer goen	
1000	—	—	—	1.400	500	1?	4 schimmels			
1000	1.300	100	200	—	1.000	0	10	15	goed	
1000	12.000	10.000	62.000	5.100	2.000	0	0 "	88	goed	
1000	—	—	—	—	—	—	—			
1000	900	300	900	500	68	13	0			
1000	1.490	80	1.540	2.200	400	0	4	137	vettig	
1000	4.300	2.600	2.900	9.000	3.000	0	54	151	vettig	
1000	192.000	40.000	210.000	2.500	100	0	2 schimmels			
1000	4.000	500	2.000	100.000	40.000	0	1	14	zuur	
1000	38.000	8.000	24.000	1.300	100	0	1 "	88	goed	
1000	—	—	—	138.000	69.000	0	2 "			
1000	4.400	600	7.600	8.500	200	5	0 (elap)			
1000	2.700	100	2.800	2.900	100	0	1 "	136	goed	
1000	± 2.000.000	?	± 2.000.000	± 3.000.000	veel	0	0 "	152	goed	
1000	18.000	68.000	20.000	1.900	60	1?	3 schimmels			
1000	<2.000	700	2.000	18.000	9.000	0	2 "	14	iets zuur	
1000	90.000	30.000	84.000	300	100	0	0	88	goed	
1000	—	—	—	92.000	31.000	0	0 "			
1000	1.600	10	1.670	2.400	100	0	0			
1000	1.390	30	880	2.200	100	0	0	136	goed	
1000	190.000	1.000	260.000	145.000	± 8.000	0	0	152	goed, iets goor	
1000	100.000	382.000	100.000	3.200	400	3?	4 schimmels			
1000	200	<100	100	4.000	2.000	0	oranje r, vlekken	13	iets goor	
1000	300	2.000	4.000	300	300	0	21 schimmels	87	goed	
1000	—	—	—	3.000	100	0	2			
1000	700	70	1.400	600	200	0	0 "			
1000	2.520	10	1.610	2.070	550	0	0	135	vettig	
1000	7.800	4.200	10.400	10.800	2.000	0	0	151	vettig	iets schimmel aan de kante
7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	

TABEL IV. Vervolg.

Bacto trypton-glucose-agar		Proteose pepton-agar + glucose + zouten + 3 % NaCl		Keuringen		
zonder onder- melk totaal aantal bacteriën	met 0.5 cc. ondermelk per plaat totaal aantal bacteriën	zonder onder- melk totaal aantal bacteriën	met 0.5 cc ondermelk per plaat totaal aantal bacteriën	Oud dagen	reuk en smaak	Opmerkingen
20.000 10.000 1.000 ± 84.000 — 6.700 5.200 ± 5.000.000	— — 1.000 ± 60.000 — ? 4 800 ± 6.000.000	10.000 110.000 500 ± 200.000 — 500 180 ± 4.000.000	— — 100 ± 320.000 — 900 300 ± 5.000.000	15 89 — — 139 153	iets goor goed — — goed? goed	— — — — — — — lekker
< 10.000 10.000 1.000 ± 700.000 8.000 4.700 500 620.000	— — 1.000 ± 440.000 4.700 4.400 1 100 590.000	? 30.000 1.100 + 1.200.000 1.000 1.000 120 490.000	— — 700 ± 1.100.000 1.400 ? 190 570.000	15 89 — — 139 153	iets goor goed — — — — zeer goed zeer goed	— — — — — — — —
3.300.000 200.000 1.000 2.000 — 1.400 1.100 5.000	— — 1.000 5.000 — 1.600 1.600 9.400	800 ± 100.000 500 1.000 — 200 ? 200	— — 15.500 1 000 — 300 1.600 1.100	15 88 — — 137 151	goed goed — — vettig vettig	— — — — — — — —
58.000 200.000 2.000 54.000 — 6.900 2.200 ± 3.000.000	— — 1.000 53.000 — 8.500 1.500 ± 3.000.000	200 ± 100.000 100 76.000 — 60 120 1.050.000	— — 100 105.000 — ? 600 900.000	14 88 — — 136 152	zuur goed — — goed goed	— — — — — — — —
6.000 37.000 500 29.000 — ? 2.800 190.000	— — 400 36.000 — 1.600 1.900 204.000	700 11.400 100 9.000 — 900 60 59.200	— — 100 23.000 — ? 280 58.000	14 88 — — 136 152	iets zuur goed — — goed goed, iets goor	— — — — — — — —
70.000 110.000 100 10.000 — 800 1 700 8 200	— — 600 ? — 1.400 3.400 9.800	2.500 260.000 100 7.000 — 40 60 1.500	— — ? 7.000 — 400 80 4.200	13 87 — — 135 151	iets goor goed — — vettig vettig	— — — — — — — iets schimmel aan de kanten

vereenigd. Op de groote tabellen IV—VII zijn de resultaten van het volledig bacteriologisch onderzoek opgenomen, terwijl daarop tevens de uitslagen van de vier keuringen zijn vermeld.

Toelichting bij de tabellen IV - VII.

In kolom 3 zijn met ● aangegeven de proeven, waarbij de contrôle op Coli positief uitviel (bij duidelijke gasvorming in de Einhornen en bevestiging op de eosine-methyleenblauwplaat). Waar een enkele maal het teeken ± staat beteekent dit, dat in de betreffende Einhorn slechts weinig gas was gevormd.

In de volgende kolommen zijn vet gedrukt de aantallen gevonden microörganismen van de boter in den (gewonen) boterkelder bewaard is geweest en dus min of meer bedorven.

Een *vraagteeken* is geplaatst in die gevallen, waarin de cijfers om de een of andere reden onbetrouwbaar zijn, of ook wanneer geen telling is verricht.

Aan elk der Tabellen IV—VII is nog een *vervolg* toegevoegd van eenige kolommen met resultaten bereikt met voedingsbodems, welke voor boter-onderzoek niet gebruikelijk zijn, maar welke door ons werden beproefd (zie blz. 9).

Tenslotte is vóór de laatste twee kolommen nog een kolom ingelascht om er de aandacht op te vestigen, dat de data van de keuringen niet steeds samenvielen met de data van bacteriologisch onderzoek.

Teneinde een duidelijker indruk te kunnen krijgen van den eventueelen invloed van de verschillende bacteriënsoorten op den smaak van de boter werden de afzonderlijke tabellen VIII—XVII samengesteld; in deze tabellen werd alleen nagegaan de invloed van koelkelder-temperatuur op microflora en smaak der versche boter, terwijl bij het einde van de proef (na 4 à 4½ maand koelkelder) bovendien nog een aansluitende periode in den boterkelder (2 en 16 dagen, d.i. gelijktijdig met de toen plaats gehad hebbende eindkeuringen) in beschouwing werd genomen.

In verscheidene der bovengenoemde gedetailleerde tabellen werd nagegaan hoe percentsgewijs het aantal bacteriën veranderde gedurende de proefperiode waarbij het oorspronkelijk aantal op 100 % werd gesteld. (Tabellen X en XI, XII en XIII, XVI en XVII.)

Ter no. tum en ze van reiding	Wijze van bewaren van de boter, waarna het onderzoek plaats vindt	Coli bacteriën in										Mout-aga	
		10 cc	1.0 cc	0.1 cc	0.01 cc	0.001 cc	aantal	aa					
		Gas in Einhorn	e. m. bl. plaat	Gas in Einhorn	e. m. bl. plaat	Gas in Einhorn	e. m. bl. plaat	Gas in Einhorn	e. m. bl. plaat	Gas in Einhorn	e. m. bl. plaat	gisten	sch
9.	Versch	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	
ereid 8/36 zuursel	3 weken in boterkelder	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	17.200	2
	2 maanden in koelkelder	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	187	
	2 maanden in koelk., 9 dg. in boterk.	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	+200.000	<
	3 maanden in koelkelder	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6	
	4 maanden in koelkelder	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	
	4 maanden in koelk., 2 dg. in boterk.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	
	4 maanden in koelk., 16 dg. in boterk.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	7 000	<
10.	Versch	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—	2	
ereid 8/36 zuursel	3 weken in boterkelder	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—	12.500	5
	2 maanden in koelkelder	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	7	
	2 maanden in koelk., 9 dg. in boterk.	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	12.700	6
	3 maanden in koelkelder	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	4 maanden in koelkelder	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	
	4 maanden in koelk., 2 dg. in boterk.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	
	4 maanden in koelk., 16 dg. in boterk.	●	●	●	●	●	●	—	—	—	—	3 210	2
11.	Versch	●	●	—	—	—	—	—	—	—	—	2	
ereid 29/8/36 montrôle	3 weken in boterkelder	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—	5.000	2
	2 maanden in koelkelder	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	
	2 maanden in koelk., 9 dg. in boterk.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	< 100	<
	3 maanden in koelkelder	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	
	4 maanden in koelkelder	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	
	4 maanden in koelk., 2 dg. in boterk.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	
	4 maanden in koelk., 16 dg. in boterk.	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—	+ 1.520	
12.	Versch	●	●	●	●	—	—	—	—	—	—	2	
ereid 8/36 zuursel	3 weken in boterkelder	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	330.000	3
	2 maanden in boterkelder	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	186	
	2 maanden in koelk., 9 dg. in boterk.	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	600	<
	3 maanden in koelkelder	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	4 maanden in koelkelder	●	●	—	—	—	—	—	—	—	—	0	
	4 maanden in koelk., 2 dg. in boterd.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	12	
	4 maanden in koelk., 16 dg. in boterk.	●	●	—	—	—	—	—	—	—	—	12.300	
13.	Versch	●	●	—	—	—	—	—	—	—	—	3	
ereid 8/36 zuursel	3 weken in boterkelder	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—	8.000	5
	2 maanden in koelkelder	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	0	
	2 maanden in koelk., 9 dg. in boterk.	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	< 100	<
	3 maanden in koelkelder	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	4 maanden in koelkelder	●	●	—	—	—	—	—	—	—	—	0	
	4 maanden in koelk., 2 dg. in boterk.	●	●	—	—	—	—	—	—	—	—	1	
	4 maanden in koelk., 16 dg. in boterk.	●	●	●	●	●	●	—	—	—	—	1.700	
14.	Versch	●	●	—	—	—	—	—	—	—	—	2	
ereid 30/8/36 montrôle	3 weken in boterkelder	+	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+400.000	5
	2 maanden in koelkelder	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	
	2 maanden in koelk., 9 dg. in boterk.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	< 100	<
	3 maanden in koelkelder	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	118	
	4 maanden in koelkelder	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	
	4 maanden in koelk., 2 dg. in boterk.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	
	4 maanden in koelk., 16 dg. in boterk.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	800	
1	2	3										4	

karnen, zuursel toe te voegen (contrôle karns gewoon aangezuurd).

Chinablauw-lactose agar				Caseïne agar		Chinablauw water agar + vet aantal vespittende bacteriën	Plaat van 20 cc uitgegoten boter	Keuringen		
er ondermelk	met 0.5 cc ondermelk per plaat							oud dagen	reuk en smaak	Opmerking
bacteriën	aantal niet melkzuur- bacteriën	aantal melkzuur- bacteriën	aantal niet melkzuur- bacteriën	totaal aantal bacteriën	aantal eiwitspittende bacteriën					
000				600	300	2 ?	0			
000 ± 3.400.000	14.000	± 3.400.000	± 2.000.000	41.000	0	0	0	22	goor	
000 9.500	200	14.500	3.300	100	3 ?	0	0	81	iets afwijkend	
000 1.800.000	22.000	320.000	300.000	6.000	0	0	0			
000 —	—	—	—	—	0	—	—			
000 2.700	30	2.100	3.000	200	0	0	0			
010 590	20	920	600	100	0	0	0	131	goed	niet lekker
000 19.800	2.800	35.800	48.000	2.000	0	0	0	145	iets bijmaak	
000				500	200	0	2 schimmels			
000 ± 2.000.000	12.000	± 2.000.000	± 2.000.000	47.000	0	0	0	22	oudsch	schimmel
000 2.300	500 ?	2.300 ?	4.000	1.300	0	2	2	81	iets afwijkend	
000 ± 1.000.000	28.000	± 900.000	± 400.000	13.000	0	0	0			
000 600	300	1.700	2.200	500	—	—	—			
000 1.200	100	3.900	4.300	400	17	0 (slap !)	0			
010 1.790	10	2.420	1.140	200	0	0	0	131	goed, iets bijmaak	niet lekker
000 550.000	2.500	900.000	1.200.000	veel	0	0	0	145	bijmaak	
000				1.800	1.200	0	0			
000 92.000	2.000	76.000	58.000	4.000	0	0	0	21	tranig	
000 1.900	300 ?	400 ?	1.200	800	0	0	0	80	ietsje vetig	
000 8.000	2.000	4.000	4.000	3.000	0	0	0			
000 —	—	—	—	—	—	—	—			
000 1.780	30	1.600	2.800	600	0	0	0			
060 1.380	20	3.120	4.600	500	0	0	0	130	vetig	
000 13.500	< 100	21.500	30.000	2.000	0	0	0	144	spekkig	
000				200	100	0	0			
000 2.400.000	20.000	2.640.000	± 2.000.000	24.000	0	0	0	21	goor	
000 11.200	4.500	± 42.000	3.900	2.100	0	0	0	80	goed	
000 300.000	70.000	400.000	210.000	6.000	0	0	0			
000 —	—	—	—	—	—	—	—			
000 1.000	100	1.900	600	140	18 ?	0	0			
010 620	10	540	1.100	200	0	0	0	130	goed	
080 66.000	1.000	64.000	40.300	300	0	0	0	144	goed	
000				300	200	0	0			
000 256.000	< 2.000	272.000	± 200.000	12.000	0	0	0	21	iets vetig	
000 5.300	1.200	7.200	2.900	300	0	0	0	80	goed	
000 154.000	20.000	230.000	140.000	6.000	0	0	0			
000 —	—	—	—	—	—	—	—			
000 1.100	< 100	2.600	3.100	200	1 ?	0	0			
010 410	10	1.530	± 144.000	90	0	0	0	130	goed	
000 202.000	370	260.000	240.000	38.000	0	0	0	144	goed	
000				300	100	0	0			
000 610.000	4.000	660.000	± 200.000	1.000	0	0	0	20	vetig	
000 900	200	800	3.300	600	0	0	0	79	ietsje vetig	
000 2.000	< 2.000	2.000	33.000	8.000	1	0	0			
000 1.100	200	900	—	—	—	—	—			
010 170	< 10	310	900	200	0	0	0			
030 250	10	310	900	120	0	0	0	129	vetig	
000 1.200	40	1.500	5.000	200	0	0	0	143	vetig	
7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	

TABEL V. Vervolg.

Bacto trypton-glucose-agar		Proteose pepton agar + glucose + zouten + 3 % NaCl		Keuringen		
zonder onder- melk totaal aantal bacteriën	met 0.5 cc ondermelk per plaat totaal aantal bacteriën	zonder onder- melk totaal aantal bacteriën	met 0.5 cc ondermelk per plaat totaal aantal bacteriën	Oud dagen	reuk en smaak	Opmerkingen
41.000 2.700.000 5.100 ± 200.000 — 510 900 91.000	± 3.000.000 9.200 ± 200.000 — 3.000 1.300 88.000	400 zeer veel 8.640 ± 100.000 — 200 2.260 54.000	zeer veel 6.900 ± 200.000 — 200 2.190 62.000	22 81 131 145	goor iets afwijkend goed iets bijmaak	 niet lekker
± 2.000 3.400 ± 100.000 2.400 3.500 1.700 1.000.000	? 2.780 ± 100.000 3.100 4.600 2.100 1.200.000	200 zeer veel 5.200 ± 150.000 600 300 850 720.000	zeer veel 3.400 ± 200.000 1.100 100 840 740.000	22 81 131 145	oudsch iets afwijkend goed, iets bijmaak bijmaak	schimmel niet lekker
200.000 43.000 780 3.000 — 1.920 4.500 19.200	42.000 620 2.000 — 3.800 5.300 25.200	300 42.800 420 2.000 — 220 1.280 3.400	67.000 280 1.000 — 200 1.080 3.900	21 80 130 144	tranig iets vettig vettig spekkig	
1.000 1.640.000 2.540 400.000 — 1.500 2.300 37.000	± 2.400.000 3.400 400.000 — 2.200 3.700 102.000	200 zeer veel ± 24.000 360.000 — 500 3.160 137.000	zeer veel 8.800 500.000 — 700 2.000 194.000	21 80 130 144	goor goed goed goed	
2.000 176.000 ± 5.000 110.000 7.400 3.000 136.000 258.000	230.000 ± 10.000 196.000 10.400 3.600 188.000 420.000	300 ± 200.000 ± 11.600 145.000 ± 23.000 400 zeer veel 130.000	± 300.000 6.400 245.000 8.700 700 zeer veel ?	21 80 130 144	iets vettig goed goed goed	
20.000 450.000 1.860 20.000 — 1.580 1.200 7.000	800.000 900 ? — 480 2.700 9.000	200 ± 500.000 240 1.000 — 50 205 1.400	± 500.000 160 5.000 — 40 285 1.200	20 79 129 143	vettig ietsje vettig vettig vettig	

Toelichting: Vanaf tabel VIII is vet gedrukt alles betrekking hebbende op de contrôle-boters, welke dus bereid zijn uit gewoon aangezuurde room.

Bij tabel VIII en IX. Meestal is bij de *versche* boter het totaal aantal bacteriën slechts weinig meer dan het aantal melkzuurbacteriën. (15 t/m 20; 9 t/m 14.)

Min of meer volgens de verwachting is het aantal melkzuurbacteriën in boter bereid uit gewoon aangezuurde room groter dan in op bijzondere wijze bereide boter (dit geldt dus evenzeer voor het totaal aantal bacteriën, zie boven), behalve bij boter 26, waar dit aantal zeer laag is.

Overigens treedt zoowel bij de contrôles als bij de proefboters groote variatie op in het aantal melkzuurbacteriën, zoodat er weinig verband valt waar te nemen tusschen de series onderling.

Wat speciaal het aantal melkzuurbacteriën betreft zien we in elke serie proeven ⁶⁾ evenmin verband tusschen de hoeveelheid toegevoegd zuursel en het aantal melkzuurbacteriën in de *versche* boter ⁷⁾.

Het hooge aantal melkzuurbacteriën in de *versche* boter van proef 18 zou wellicht verklaard kunnen worden uit een niet homogene verdeling van deze bacteriën in de boter zelf, tengevolge van de bereidingswijze. Immers door toevoeging van zuursel aan het laatste waschwasser zou het kunnen zijn, dat plaatselijk klontjes melkzuurbacteriën in de boter beland zijn, waardoor een daar ter plaatse genomen monster een uitzonderlijk hoog aantal melkzuurbacteriën per cc zou te zien geven.

Bij tabel VIII. Het aantal *melkzuurbacteriën* zoowel als het *totale aantal bacteriën* neemt gedurende het verblijf in den koelkelder sterk af.

Bij tabel IX. Vergeleken met tabel VIII is zoowel het aantal melkzuurbacteriën als het totale aantal bacteriën, gedurende de

⁶⁾ Wij dienen hierbij te bedenken dat iedere serie proeven uit 2 op verschillende dagen bereide gedeelten bestaat. (Bij de vertikale indeeling der tabellen is hiermede rekening gehouden).

⁷⁾ In de serie 11—9—10 valt bij uitzondering wel een duidelijk afnemend aantal melkzuurbacteriën waar te nemen.

Proef no. Datum en wijze van bereiding	Wijze van bewaren van de boter, waarna het onderzoek plaats vindt	Coli bacteriën in										Mout-agar	
		10 cc		1.0 cc		0.1 cc		0.01 cc		0.001 cc		aantal gisten	aantal schimmels
		Gas in Einhorn	e. m. bl. plaat	Gas in Einhorn	e. m. bl. plaat	Gas in Einhorn	e. m. bl. plaat	Gas in Einhorn	e. m. bl. plaat	Gas in Einhorn	e. m. bl. plaat		
15. bereid 9/9/36 % zuursel	Versch 3 weken in boterkelder 2 maanden in koelkelder 2 maanden in koelk., 9 dg. in boterk. 3 maanden in koelkelder 4 maanden in koelkelder 4 maanden in koelk., 2 dg. in boterk. 4 maanden in koelk., 16 dg. in boterk.	● + + + — ● ● ●	● — — — — ● ● ●	● + + + — ● ● ●	● — — — — ● ● ●	● + + + — — ● ●	● — — — — — ● ●	— + — + — — — —	— — — — — — — —	— + — — — — — —	— — — — — — — —	16 585.000 ± 450 ± 22.000 ± 2.000 0 106 54.000	2 1 10 5 5 0
16. bereid 9/9/36 % zuursel	Versch 3 weken in boterkelder 2 maanden in koelkelder 2 maanden in koelk., 9 dg. in boterk. 3 maanden in koelkelder 4 maanden in koelkelder 4 maanden in koelk., 2 dg. in boterk. 4 maanden in koelk., 16 dg. in boterk.	● + + + — ● — ●	— — — — — ● ● ●	● + + + — — ● ●	— — — — — — ● ●	● — — + — — ● ●	— — — + — — — —	— — — — — — — —	— — — — — — — —	— — — — — — — —	— — — — — — — —	2 26.000 19 3.900 — 0 7 200	2 0 10 0 0 0 0 0
17. bereid 3/9/36 ontrôle	Versch 3 weken in boterkelder 2 maanden in koelkelder 2 maanden in koelk., 9 dg. in boterk. 3 maanden in koelkelder 4 maanden in koelkelder 4 maanden in koelk., 2 dg. in boterk. 4 maanden in koelk., 16 dg. in boterk.	● + — — — — — —	— — — — — — — —	— — — — — — — —	— — — — — — — —	● — — — — — — —	● — — — — — — —	— — — — — — — —	— — — — — — — —	— — — — — — — —	— — — — — — — —	5 29.000 0 5.400 — 0 4 15	9 11 0 0 0 0 0 0
18. bereid 9/9/36 % zuursel	Versch 3 weken in boterkelder 2 maanden in koelkelder 2 maanden in koelk., 9 dg. in boterk. 3 maanden in koelkelder 4 maanden in koelkelder 4 maanden in koelk., 2 dg. in boterk. 4 maanden in koelk., 16 dg. in boterk.	● + + + — ● ● ●	— — — — — ● ● ●	● + + + — — ● ●	— — — — — — ● ●	● + + + — — ● ●	— — — — — — — —	— — — + — — — —	— — — — — — — —	— — — — — — — —	— — — — — — — —	40 500.000 ± 750 11.800 470 0 15 1 010	5 0 0 0 0 0 0 0
19. bereid 3/9/36 % zuursel	Versch 3 weken in boterkelder 2 maanden in koelkelder 2 maanden in koelk., 9 dg. in boterk. 3 maanden in koelkelder 4 maanden in koelkelder 4 maanden in koelk., 2 dg. in boterk. 4 maanden in koelk., 16 dg. in boterk.	— + + + — — — —	— — — — — — — —	— + + + — — — —	— — — — — — — —	— + + + — — — —	— — — — — — — —	— — — — — — — —	— — — — — — — —	— — — — — — — —	— — — — — — — —	0 ± 700.000 0 ± 60.000 — 0 0 200	0 1 1 1 1 1 1 1
20. bereid 4/9/36 ontrôle	Versch 3 weken in boterkelder 2 maanden in koelkelder 2 maanden in koelk., 9 dg. in boterk. 3 maanden in koelkelder 4 maanden in koelkelder 4 maanden in koelk., 2 dg. in boterk. 4 maanden in koelk., 16 dg. in boterk.	● + + + — — — —	● — — — — — — —	— + + + — — — —	— — — — — — — —	— + + + — — — —	— — — — — — — —	— — — — — — — —	— — — — — — — —	— — — — — — — —	— — — — — — — —	15 40.000 173 4.100 — 0 0 500	2 1 1 1 1 1 1 1
1	2	3										4	

laatste waschwater zuursel is toegevoegd (contrôle karns gewoon aangezuurd).

Chinablauw-lactose agar				Caseïne agar		Chinablauw water agar + vet aantal vetspitsende bacteriën	Plaat van 20 cc uitgegoten boter	Keuringen		
er ondermelk	met 0.5 cc ondermelk per plaat			totaal aantal bacteriën	aantal eiwitspitsende bacteriën			oud dagen	reuk en smaak	Opmerking
bacteriën	aantal niet melkzuur- bacteriën	aantal melkzuur- bacteriën	aantal niet melkzuur- bacteriën							
000		±120000		5.200	100	0	0			
000	20.000	140.000	1.300.000	890.000	150.000	0	0	16	bederf	veel schimmel
000	6.100	3.800	8.900	11.200	2.100	0	1	75	goed	
000	740.000	6.000	18.000	1.600.000	<24.000	0	0			
000	—	—	—	116.000	14.000	—	—			
000	1.500	100	2.700	2.000	100	0	0			
60	2.240	140	5.760	11.800	400	0	0	125	goed	
000	±1.300.000	170.000	±1.000.000	746.000	146.000	0	0	139	goed	
000		148.000		2.400	100	0	0			
000	80.000	280.000	130.000	35.000	1.000	0	veel vlekken	16	bederf	veel schimmel
000	3.100	1.300	2.600	2.800	600	1	0	75	goed	
000	36.000	48.000	88.000	12.200	3.900	0	0			
000	—	—	—	—	—	—	—			
000	5.300	<100	5.500	4.700	400	0	0			
90	1.950	60	3.800	5.400	300	0	0	125	zeer goed	
1	totaal ± 56.000	± 33.000	± 10.400	79.000	31.000	0	0	139	goed	
000		560.000		900	300	6 ?	0			
000	100.000	160.000	90.000	13.000	<1.000	0	veel vlekken	15	iets zuur	
000	2.000	800	3.000	1.900	200	1 ?	0	74	goed	
000	36.000	80.000	±700.000	7.000	2.000	0	0			
000	—	—	—	—	—	—	—			
30	1.220	10	870	2.200	100	0	0			
40	3.200	10	3.020	2.300	20	0	0	124	vettig	
000	7.000	900	8.900	9.000	<100	0	7 sch.	138	vettig	a.d. kanten enkele schimm
000		810.000		10.500	300	0	0			
000	300.000	670.000	310.000	58.000	27.000	0	0	15	bederf	zeer veel schin
000	3.800	4.100	5.200	10.600	300	0	0	74	goed	
000	±75.000	1.400	104.000	107.000	12.000	0	0			
000	—	—	—	—	—	—	—			
000	2.800	300	1.900	5.900	400	0	1 sch.			
80	4.600	120	5.160	10.400	300	0	0	124	iets afwijkend	
000	±500.000	2.300	±600.000	548.000	118.000	0	0	138	goed ?	iets schimmel boven op en aan de kanten
000		80.000		700	100	0	0			
000	150.000	570.000	900.000	106.000	1.000	0	veel vlekken	15	bederf	veel schimmel
000	1.300	1.100	1.000	2.900	300	1 ?	0	74	iets afwijkend	
000	80.000	72.000	154.000	118.000	14.000	0	0			
000	—	—	—	—	—	—	—			
40	760	40	1.040	2.100	100	0	0			
90	1.390	90	1.350	700	60	0	0	124	afwijkend	
000	265.000	26.000	290.000	300.000	±91.000	0	0	138	zeer goed	iets schimmel boven op en aan de kanten
000		950.000		400	200	0	0			
000	240.000	650.000	300.000		<1.000	0	veel vlekken	14	goed	
000	1.600	100	3.000	2.700	<100	0	0	73		
000	18.000	4.000	20.000	15.000	1.000	0	0			
000	—	—	—	250	100	—	—			
60	2.900	360	3.760	2.200	300	0	2 sch.			
60	5.060	20	7.060	8.700	50	0	12 sch.	123	vettig	
90	90.000	2.300	130.000	23.400	veel	0	grauw bruine stipjes (vuil ?)	137	vettig	(enkele schimmels aan de)
7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	

TABEL VI. Vervolg.

Bacto trypton-glucose-agar		Proteose pepton agar + glucose + zouten + 3% NaCl		Keuringen		
zonder onder- melk totaal aantal bacteriën	met 0.5 cc ondermelk per plaat totaal aantal bacteriën	zonder onder- melk totaal aantal bacteriën	met 0.5 cc ondermelk per plaat totaal aantal bacteriën	Oud dagen	reuk en smaak	Opmerkingen
11.000 ± 800.000 5.900 720.000 ± 7.000 3.400 13.200 1.600.000	± 970.000 ? 700.000 ± 8.000 4.000 14.900 1.160.000	5.200 ± 400.000 7.200 ± 800.000 6.000 100 1.790 780.000	± 750.000 10.600 ± 1.200.000 6.900 400 1.870 700.000	16 75 125 139	bederf goed goed goed	veel schimmel
3.000 146.000 2.900 94.000 — 3.900 4.400 195.000	176.000 4.200 ? 4.400 7.000 260.000	1.260 16.000 400 146.000 — ≤ 20 970 82.000	18.000 2.100 66.000 — 20 1.065 133.000	16 75 125 139	bederf goed zeer goed goed	veel schimmel
1.000 42.000 900 14.000 — 2.800 10.300 13.000	74.000 2.200 ? 2.900 ? 18.000	≤ 20 8.000 100 12.000 — 30 110 100	12.000 200 28.000 — ? 450 500	15 74 124 138	iets zuur goed vettig vettig	
364.000 434.000 ± 600 104.000 1.700 4.400 ? 170.000	630.000 ± 480 108.000 3.400 3.900 ? ?	400 320.000 400 66.000 — 80 ? 373.000	740.000 480 118.000 — 260 3.100 432.000	15 74 124 138	bederf goed iets afwijkend goed ?	zeer veel schimmel
≤ 10.000 ± 800.000 3.200 168.000 — 1.600 240 570.000	150.000 ± 800.000 3.800 174.000 — 1.400 1.560 510.000	≤ 100 ± 100.000 300 140.000 — 120 550 213.000	2.200 1.100.000 900 184.000 — ? 750 230.000	15 74 124 138	bederf iets afwijkend afwijkend zeer goed	veel schimmel
270.000 154.000 1.800 10.000 — 4.900 7.600 45.600	250.000 222.000 2.400 18.000 — 4.700 11.500 51.200	900 ? 900 6.000 — ≤ 20 340 6.000	20.000 ? 500 24.000 — 60 1.180 13.000	14 73 123 137	goed vettig vettig	

(enkele schimmels aan
de kanten)

naperiode van 14 dagen boterkelder weer belangrijk toegenomen, vooral waar het de proefboters betreft.

In tabellen X en XI komt zulks tengevolge van de procentische uitdrukkingswijze nog duidelijker tot uiting; in sommige gevallen is de toename van het aantal melkzuurbacteriën gedurende de 14-daagsche naperiode in den boterkelder zoo sterk toegenomen, dat het oorspronkelijk erin aanwezige aantal overtroffen wordt (zie de boters 3, 25, 22, 15 en 21).

Bij tabellen XII en XIII. Voor de procentische verandering van het totale aantal bacteriën geldt eigenlijk hetzelfde als hetgeen voor de tabellen X en XI omtrent de melkzuurbacteriën vermeld staat. Hier is de toename van het totale aantal bacteriën in de proefboters nog grooter. Wat de gewoon aangezuurde boters betreft valt hier een uitzondering waar te nemen bij boter 26, waarin gedurende de koelhuis-periode, na een inzinking, een belangrijke vermeerdering van het totale aantal bacteriën plaats had; wij moeten echter opmerken dat in de versche boter 26 het aantal melkzuurbacteriën en het totale aantal bacteriën bijzonder laag was (vgl. bv. tabel VIII).

In tabellen XIV en XV is de vermeerdering van het aantal *gisten* nagegaan.

Het aantal gisten blijkt gedurende het begin van de koelkelderperiode in sommige gevallen te kunnen toenemen (boters 9, 12, 14, 20, 18, 15). Aan het eind van de koelkelderperiode was het aantal gisten voor alle boters weer zeer laag, zoodat in de meeste gevallen zelfs geen gisten op de telplaten konden worden gevonden (zie kolom 8); het verblijf in den boterkelder van 2 dagen gaf in het meerendeel der boters reeds een geringe vermeerdering van het aantal gisten te zien (kolom 9); een 14 dagen langer verblijf in den boterkelder had aanzienlijk verdere toename tengevolge (kolom 11), behalve bij boters 5 en 3. Merkbare invloed van het al dan niet verzuren van den gebruikten room, werd hier niet gevonden. De sterke vermeerdering van het aantal gisten in de meeste boters gedurende de boterkeldernaperiode, is wat den smaak betreft verder niet van invloed geweest op de laatste keuringsuitslag.

Bij tabellen XVI, XVII en XVIII. Het aantal *eiwitsplitsende bacteriën* neemt gedurende de koelkelderperiode over het alge-

Boter no. datum en wijze van bereiding	Wijze van bewaren van de boter, waarna het onderzoek plaats vindt	Coli bacteriën in										Mout-agar	
		10 cc	1.0 cc	0,1 cc	0.01 cc	0.001 cc	aantal gisten	aantal schimmels					
		Gas in Einhorn	e. m. bl. plaat	Gas in Einhorn	e. m. bl. plaat	Gas in Einhorn	e. m. bl. plaat	Gas in Einhorn	e. m. bl. plaat	gas in Einhorn	e. m. bl. plaat		
21 bereid 9/9/'36 % zuursel	Versch 3 weken in boterkelder 2 maanden in koelkelder 2 maanden in koelk., 9 dg. in boterk. 3 maanden in koelk., 9 dg. in boterk. 4 maanden in koelkelder 4 maanden in koelk., 2 dg. in boterk. 4 maanden in koelk., 16 dg. in boterk.	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	3 30 000 0 < 200 < 10 2 0 140	4 < 1 0 < 2 < 2 4 1 2
22 bereid 9/9/'36 % zuursel	Versch 3 weken in boterkelder 2 maanden in koelkelder 2 maanden in koelk., 9 dg. in boterk. 3 maanden in koelk., 9 dg. in boterk. 4 maanden in koelkelder 4 maanden in koelk., 2 dg. in boterk. 4 maanden in koelk., 16 dg. in boterk.	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	12 23.000 14 < 200 3.400 0 1 ± 13.000	1 2.0 2 < 2 33.0 0 48 0
23 bereid 9/10/9/'36 contrôle	Versch 3 weken in boterkelder 2 maanden in koelkelder 2 maanden in koelk., 9 dg. in boterk. 3 maanden in koelk., 9 dg. in boterk. 4 maanden in koelkelder 4 maanden in koelk., 2 dg. in boterk. 4 maanden in koelk., 16 dg. in boterk.	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	3 43.000 0 < 200 280 0 0 40	1 9.0 0 < 2 < 2 1 9 10
24 bereid 10/9/'36 % zuursel	Versch 3 weken in boterkelder 2 maanden in koelkelder 2 maanden in koelk., 9 dg. in boterk. 3 maanden in koelk., 9 dg. in boterk. 4 maanden in koelkelder 4 maanden in koelk., 2 dg. in boterk. 4 maanden in koelk., 16 dg. in boterk.	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	4 70.000 6 8.000 — 3 6 4.400	2 < 1 0 20 1 1 20
25 bereid 10/9/'36 % zuursel	Versch 3 weken in boterkelder 2 maanden in koelkelder 2 maanden in koelk., 9 dg. in boterk. 3 maanden in koelk., 9 dg. in boterk. 4 maanden in koelkelder 4 maanden in koelk., 2 dg. in boterk. 4 maanden in koelk., 16 dg. in boterk.	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	3 26.000 0 < 200 — 0 1 20	4 < 1 2 < 2 0 0 2 0
26 bereid 0/11/9/'36 contrôle	Versch 3 weken in boterkelder 2 maanden in koelkelder 2 maanden in koelk., 9 dg. in boterk. 3 maanden in koelk., 9 dg. in boterk. 4 maanden in koelkelder 4 maanden in koelk., 2 dg. in boterk. 4 maanden in koelk., 16 dg. in boterk.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5 258.000 8 5.400 — 0 3 8.600	0 < 1 2 60 0 2 0
1	2	3										4	

atste waschwater zuursel is toegevoegd (contrôle karns gewoon aangezuurd).

Chinablauw-lactose agar			Caseïne agar		Chinablauw water agar + vet aantal vetplitsende bacteriën	Plaat van 20 cc uitgegoten boter	Keuringen		
ondermelk	met 0.5 cc ondermelk per plaat						oud dagen	reuk en smaak	Opmerkingen
aantal niet melkzuur- bacteriën	aantal melkzuur- bacteriën	aantal niet melkzuur- bacteriën	totaal aantal bacteriën	aantal eiwitspplitsende bacteriën					
0	< 1.000	200	60	0	0	0			
0 4.140.000	< 10.000	9.000.000	± 2.000.000	72.000	0	0	14	muf	
0 3.500	900	34.000	8.400	1.000	94	0	68	goed	
0 41.000	< 100	72.000	52.000	7.000	0	0			
0 —	—	—	—	—	—	—			
0 1.300	< 100	5.100	270	200	0	0			
0 880	40	2.700	3 200	200	1	0	118	goed	
0 48.500	11.000	76.000	116.000	8.000	0	0	132	goed	
0 —	—	—	—	—	—	—			
0 4.400.000	50.000	4.500.000	± 2.000.000	44.000	0	1	14	muf, sterk	
0 5.100	900	4.900	2 700	300	175	0	68	goed	
0 330.000	300	122.000	195.000	17.000	0	0			
0 —	—	—	—	—	—	—			
0 2.200	200	2.100	2.800	400	0	0 (slap!)			
0 22 720	20	32.400	2.500	150	0	0	118	goed	
0 139.000	26.200	260.000	258.000	4.000	0	0	132	goed	
0 —	—	—	—	—	—	—			
0 130.000	< 10.000	160.000	900	100	0	0			
0 800	200	1.800	2.300	500	110	0	13	zeer vettig	
0 14.000	< 100	10.000	3.000	2 000	0	0	67	ietsje vettig	
0 1.600	10	800	—	—	—	—			
0 1.220	100	1.260	2.600	200	0	0 (slap!)			
0 530	< 10	760	1.500	300	0	53 sch.	117	vettig	
0 130	430	2.370	1.000	< 100	0	0 (slap)	131	spekkig	
0 —	—	—	—	—	—	—			
0 12.000.000	< 10.000	13.000.000	900	100	0	0			
0 700	< 100	400	1.500	300	74	0	13	vettig	
0 ± 360.000	100	± 400.000	47.000	2.000	0	0	67	goed	
0 42.000	30	44.000	—	—	—	—			
0 360	30	770	2.800	300	0	0 (slap!)			
0 2.970	10	3.600	1.000	180	0	0	117	goed	
0 45.600	2.350	79.000	41.000	100	0	0	131	goed	
0 —	—	—	—	—	—	—			
0 3.100.000	< 10.000	?	900	300	0	0			
0 300	< 100	1.100	1.700	200	54	4	13	iets bederf	
0 76.000	38.000	110.000	63.000	26.000	0	0	67	iets afwijkend	
0 10	—	—	—	—	—	—			
0 160	40	610	2.400	200	0	0 (slap!)			
0 2.040	50	3.100	4.600	210	0	0	117	goed?	
0 17.000	24.000	34.000	22.800	6.400	0	0 (slap!)	131	goed	
0 —	—	—	—	—	—	—			
0 140.000	< 2.000	150.000	3.900	1.100	0	0	12	zeer vettig	
0 1.200	< 10.000	2.100	± 600.000	1.000	0	0	66	ietsje vettig	
0 8.000	< 100	33.000	1.900	200	1	0			
0 —	100	—	9.000	1.000	0	0			
0 ± 11.000	130	± 9.000	30.200	400	0	0			
0 2.700	< 20	5.760	26.100	300	0	0	116	vettig	
0 14.400	150	17.350	23.000	100	0	0 (+ vlekjes)	130	spekkig	
7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

TABEL VII. Vervolg.

Bacto trypton-glucose-agar		Proteose pepton agar + glucose + zouten + 3 % NaCl		Keuringen		
zonder onder- melk totaal aantal bacteriën	met 0.5 cc ondermelk per plaat totaal aantal bacteriën	zonder onder- melk totaal aantal bacteriën	met 0.5 cc ondermelk per plaat totaal aantal bacteriën	Oud dagen	reuk en smaak	Opmerkingen
1.000 3 000.000 6 600 44.000 — 4.400 1.400 81.000	2.000 4.800.000 5.100 78.000 — 5.800 2.900 115.000	100 3.120.000 3.500 184.000 — 2.100 700 49.500	4000 ? 3.100 162.000 — 1.700 1.300 170.000	14 68 118 132	muf goed goed goed	
1.000 1 300.000 ± 30.000 ± 600.000 220 000 3.000 14.700 336.000	3.000 2.240.000 5.800 ± 600 000 230.000 ? 28.800 684.000	800 2 400 000 4.900 ± 900.000 470.000 300 zeer veel 10.000	1 300 ± 3.000.000 8.000 ± 2.000.000 ? 500 zeer veel 43 000	14 68 118 132	muf, sterk goed goed goed	
< 2.000 38.000 1.300 4.000 — 3.500 1.000 1 000	3.000 42.000 1.400 2.000 — 3.600 1 600 2.200	400 82.000 1.180 < 2.000 — 60 170 200	300 76.000 1.080 2.000 — 120 100 500	13 67 117 131	zeer vetting ietsje vetting vetting spekkig	
< 10.000 5.600 000 1.100 ± 600 000 80.000 2.400 1.400 292.000	30.000 6.500.000 1.300 ± 480.000 — 3.200 2.800 ?	600 5.000.000 500 ± 900.000 60.000 1.040 7.900 530.000	700 ± 10.000.000 1.100 ± 840.000 — ? 5 200 510.000	13 67 117 131	vetting goed goed goed	
30 000 254.000 1.700 300.000 — 2.300 3.800 68.000	30.000 ± 600 000 1.800 280.000 — 3.400 4.400 ?	300 650.000 700 230.000 — 40 3.400 37.000	1.200 ± 1.000.000 400 300.000 — ? 3.060 40.000	13 67 117 131	iets bederf iets afwijkend goed ? goed	
< 2.000 620 000 1.500 26.000 — 34.000 ? ?	8.000 620.000 800 40.000 — 28.600 28.400 ?	200 534.000 200 28 000 — 820 ± 100.000 20.000	500 528.000 300 8.000 — 1.100 zeer veel 20.000	12 66 116 130	zeer vetting ietsje vetting vetting spekkig	

meen niet onbelangrijk toe, en gedurende de boterkelder-naperiode (kolom 11) zelfs in zeer sterke mate. Het laatste geldt vooral voor de niet-gezuurde boters, zoodat hier volgens de verwachting invloed van het zure milieu merkbaar is. Evenmin als bij de gisten heeft de sterke vermeerdering van het aantal eiwitsplitsende bacteriën hier merkbare invloed op den smaak.

Wij hebben getracht de herkomst van het aantal eiwitsplitsende bacteriën in de versche boter na te gaan, en geven in tabel XVIII een vergelijking der eiwitsplitsers per cc gepasteuriseerde room en per cc uit denzelfden room bereide versche boter.

De aanwezigheid van *Coli bacteriën* en de verandering van het aantal daarvan gedurende de proefperiode kan worden nagegaan uit de groote tabellen IV—VII. In tabel XIX is wederom naast elkaar weergegeven de aanwezigheid van coli-bacteriën in den gepasteuriseerden room en in de versche uit dien room bereide boter; het valt op dat in 2 van de 3 gevallen waar in den room geen coli-bacteriën werden gevonden, de boters eveneens vrij van coli bleken te zijn (boters 9 en 19). Op boter 15 na werd het omgekeerde ook steeds geconstateerd. Verder is te zien, dat de boters bereid uit gezuurde room dikwijls minder coli-bacteriën bevatten dan de uit zoete room bereide karns, en dat het aantal coli bacteriën in de eerste (vgl. tabellen IV—VII) gedurende de proefperiode ook niet toeneemt (of zelfs afneemt) terwijl bij de laatste dikwijls wel toename plaats heeft (een uitzondering vormt boter 11, waar aan het einde van de proef een geringe vermeerdering werd gevonden). De oorspronkelijk in de normaal bereide boters aanwezige melkzuurbacteriën schijnen hier dus wel eenige remmende invloed uit te oefenen op de ontwikkeling van de coli-bacteriën. Ook het „zouten” blijkt van invloed te zijn, in de gezouten boters (zie tabellen V en VII) heeft gedurende de proefperiode over het algemeen minder toename van de coli-bacteriën plaats, dan in de ongezoeten boters (zie tabellen IV en VI).

Bij tabel XX. Hierin werd alleen aangeteekend de ontwikkeling van *schimmels* waargenomen aan de boters bij de keuringen zelf. Bij het bacteriologisch onderzoek werden op de telplaten weliswaar ook schimmels gevonden (zie kolom 5 van de tabellen IV—VII), maar deze aantallen mogen niet steeds betrouwbaar

worden geacht, daar bijkomende schimmelinfectie uit de lucht op de telplaten veelal moeilijk te vermijden was. In tabel XX springt wel duidelijk in het oog de invloed van het zouten der boter op de schimmelontwikkeling (vgl. ook in het literair-gedeelte op pag. 4, onder Macy noot 19).

Uit de tabellen IV—VII blijkt dat *vetsplitsende bacteriën* in boters van deze series proeven geen rol spelen.

N. B. De invloed van het zouten op de ontwikkeling van melkzuurbacteriën, en van het totale aantal bacteriën, was bij onze proeven niet duidelijk merkbaar (vgl. de kolommen 3, 5 en 11, resp. 4, 6 en 12 in de tabellen VIII en IX onderling).

De ontwikkeling der gisten ondervond bij onze proeven geen remmende invloed van het keukenzout, integendeel werd aan het eind van de proefperiode meestal juist het tegenovergestelde waargenomen (vgl. kolom 11 in de tabellen XIV en XV). Hiertegenover staat dat de eiwitsplitsende bacteriën aan het eind van de proefperiode zich in de ongezouten boters meestal wel sterker vermeerderd hebben dan in de gezouten boters; dit komt vooral duidelijk tot uiting in kolom 11 van tabel XVII.

Eindoverzicht.

Wanneer wij den *smaak* van de boters, zooals die bij de verschillende keuringen aan de diverse boters telkens werd toegekend, nagaan, valt sterk op:

dat de boters van alle contrôle-proeven (d.i. bereid uit normaal gezuurde room) op den duur *vettig of spekkig zijn geworden*, terwijl de smaak der eigenlijke proef-boters aan het einde van de proefperiode nog *goed* was, behalve bij uitzondering een geringe bijmaak of geringe afwijking. Zie de tabellen IV - VII, en voor de keuringsuitslagen speciaal de tabellen III en III (vervolg). Hierin ligt dan ook wel de belangrijkste conclusie opgesloten, welke wij uit deze proeven kunnen trekken.

Het resultaat van de proefnemingen als geheel is dan ook goed geslaagd te achten, waar de eindkeuringen der zoetgekarnde boters (na 4½ maand koelkelder + 16 dagen boterkelder) nog boter van over het algemeen uitstekenden smaak aanwees.

In dit verband dienen wij er echter de aandacht op te

vestigen, dat de temperatuur van den boterkelder (d.w.z. in de naperiode) 10—12° C, d.i. dus vrij laag, was.

De temperatuur in den koelkelder varieerde van —9° tot —7° C.

Het smaakgebrek „vettig” (en „spekkig”) is vergelijkbaar met het gebrek olie-achtig en talkig zooals dat voor melk wordt beschreven, en hetgeen berust op de oxydatie van de olie-zuur component van het botervet, en is dan een zuiver chemische reactie (vgl. bv. Kende, Zuivelcongres Kopenhagen 1931, Supplement Duitsch p. 20; Molkerei Zeitung Hildesheim 1931, no. 102, (*refer. le Lait* 14, 614 (1934)); Zuivelcongres Rome—Milaan 1934, 2e Sectie (Eng.), p. 1).

Volgens Génin zullen deze chemische veranderingen in het bijzonder op den voorgrond treden bij gezouten boter van gezuurde room (vgl. dit verslag pag. 3 noot 12). Volgens Orla-Jensen en Otte worden de chemische veranderingen sterk bevorderd door melkzuur en metaalzouten (vgl. dit verslag pag. 4 noot 13). In tabel X e.v. komt dit duidelijk tot uiting, bij de keuring na 2 maanden koelkelder (kolommen 6, vet gedrukt). Na een langer verblijf dan 2 maanden in den koelkelder werden ook de ongezuurde boters vettig.

Bij de gebreken aan zoetgekarnde boters zouden bacteriologische invloeden hoofdzaak zijn (zie eveneens onder noot 12 in dit verslag op pag. 3). Onze zoetgekarnde boters bleven nagenoeg alle, en tot het einde der boterkelder-periode, goed van smaak. Toch hadden, zooals in de tabellen XII en XIII is te zien, de bacteriën zich *gedurende de boterkelder-periode* zeer sterk vermenigvuldigd, blijkbaar waren dus deze groote aantallen nog niet voldoende om in de boters smaakafwijkingen te veroorzaken. Het is ook duidelijk te zien, dat de bacteriën in de zoetgekarnde boters gedurende de boterkelder-periode veel sterker in aantal toenemen dan in de gezuurde boters (zie ook blz. 25 en 29), waaruit dus blijkt, dat in het algemeen de roomzuuring de naderhand in de boter plaats hebbende vermenigvuldiging der bacteriën remt. Aan de hand van de literatuur (b.v. Kende, zie boven) vragen wij ons af, of het groote aantal bacteriën⁸⁾ hier niet zijn goede zijde heeft, immers zullen daaronder in het

⁸⁾ Vanzelfsprekend mogen zich daaronder geen vetsplitsende bacteriën bevinden, hetgeen bij onze proeven dan ook niet het geval was (vgl. blz. 34).

algemeen veel zuurstof-absorbeerende soorten bacteriën kunnen voorkomen (d.z. soorten met reduceerende eigenschappen) waardoor luchtzuurstof in eerste instantie wordt weggenomen en op die wijze de oxydatie van de olie-zure vetcomponent onmogelijk wordt. Dat bij onze proeven inderdaad sterk reduceerende bacteriën in het spel geweest zijn, bleek ons doordat sommige van de chinablauw-lactose-agar platen bij de zoetgekarnde boters na cultiveeren geheel ontkleurd waren (zie ook dit verslag blz. 11).

Lang voor het einde der boterkelder-periode echter, werd het smaak-gebrek vettig bij de zuurgekarnde boters waargenomen. Dit was reeds het geval bij boters in den koelkelder (zie kolommen 5 - 6 en 9 - 10 in tabellen XII en XIII) toen het aantal bacteriën in *alle* boters nog zeer laag was. De belemmering van de oxydatie, speciaal voor de zoetgekarnde boters, kan hier dus niet worden toegeschreven aan het hooge aantal bacteriën, maar mogelijk kan hier wel sprake zijn van een meerdere activiteit van de bacteriën in deze zoetgekarnde boters. Immers, wanneer het zure milieu der zuurgekarnde boters de vermeerdering der bacteriën tegen kan gaan, zal ook wel de activiteit, en de daarmee samenhangende stofwisselnig (o.a. de zuurstofopname) worden geremd.

In dit verslag werden tot hiertoe uitsluitend de resultaten vermeld van het bacteriologische gedeelte van het verrichte onderzoek; dit is in overeenstemming met doel en opzet onzer onderzoekingen (vgl. dit verslag p. 8), waarbij aan de bacteriologische zijde van het hier behandelde onderwerp sterke aandacht moest worden besteed.

Ter aanvulling werden echter ook een aantal *chemische* en *physische grootheden* vastgelegd, en wel hoofdzakelijk voor de *versch* bereide boters (vgl. Tabel II). De vastlegging van deze gegevens (voor de *versch* bereide boters) leek ons speciaal gewenscht om zodoende de verschillende uitgang producten vooral ook in chemisch opzicht zoo scherp mogelijk te kunnen definieeren.

Wij zijn er niet toe overgegaan om gedurende de bewaringsproeven zelf sommige dezer physische en chemisch grootheden opnieuw te bepalen. Waar de keuringsuitslagen tegen het einde van de proef-periode zoo'n sterk smaak-onderscheid opleverden

tusschen de (gunstige) zoetgekarnde boters en de talkig-vettige contrôle-boters (vgl. p. 34), hetgeen vermoedelijk in hoofdzaak aan chemische veranderingen speciaal voor de talkig geworden boters moet worden toegeschreven (oxydatie), leek het ons echter wel van belang om opnieuw de joodgetallen te bepalen van de aan het einde van de bewaringsperiode resteerende boters. Daarbij is ons opgevallen dat de joodgetallen over het algemeen iets gestegen waren ⁹⁾, terwijl dit in het algemeen in sterkere mate gold voor de zoetgekarnde dan voor de zuurgekarnde boters. Dit laatste zou er wellicht werkelijk op kunnen duiden, dat de talkig geworden boters door inwerking der luchtzuurstof inderdaad toch nog een geringe vermindering van het oorspronkelijk onverzadigd karakter harer vetzuren hebben ondergaan.

Speciaal het verschijnsel der joodgetallen-verhooging bij het bewaren van koelhuisboter in het algemeen vereischt overigens een herhaald onderzoek ter nadere bevestiging. Op dit moment vallen hierover nog geen nadere gegevens te vermelden.

Conclusie:

Aan de hand van de keuringsuitslagen zou men mogen besluiten om voor het bereiden van koelhuisboter van goede kwaliteit uit te gaan van ongezuurde room, waarbij men, ten einde zich van een uiteindelijke goede botersmaak te verzekeren, verstandig doet om aan het laatste waschwater ¹⁰⁾ een zekere hoeveelheid ¹¹⁾ zuursel toe te voegen. Wanneer men zich verder zoo goed mogelijk wil vrijwaren tegen schimmelontwikkeling verdient het aanbeveling om de boter te zouten (vgl. tabel XX).

LITERATUUROVERZICHT.

- (1) Kr. Støren, Koldlagring av smør og ost, Norsk Meieritidende, **30**, 111—120, (1930).
- (2) W. White, C. S. Trimble and H. L. Wilson, Keeping quality of butter

⁹⁾ De joodgetallen der oorspronkelijke versche boters zijn op zichzelf bovendien hoog te noemen (vgl. Tabel II).

¹⁰⁾ Wij verkiezen deze werkwijze boven het toevoegen van zuursel aan den room vlak voor het karnen, omdat de keuringsuitslagen van op de laatste wijze bereide boters iets minder gunstig waren (bijsmaken).

¹¹⁾ Volgens de genomen proeven schijnt een hoeveelheid van $\frac{1}{2}$ % reeds voldoende te zijn.

- made from cream of various acidities. U. S. Dept. of Agriculture, Techn. Bull. 159, 1929.
- (3) L. A. Rogers and C. E. Gray, Bur. An. Ind. U. S. Dept. Agric., Bull. 114, (1909).
 - (4) L. A. Rogers, Proc. 3rd Intern. Congr. Refrigeration 2, 667 (1913), geciteerd in Rogers' ass. Fundamentals of Dairy Science, 2nd Ed. p. 92.
 - (5) P. S. Arup en G. van B. Gilmour, Investigations to test bacteriologically and chemically the effect of cold storage on the keeping qualities of Irish Free State Creamery Butter, J. Dept. of Agric., Irish Free State 31, 179—189, (1932)
 - (6) G. Loftus-Hills, L. R. Scharp en T. S. Bellair, A study of factors influencing the keeping quality of some Victorian salted butters in cold storage, J. of Dairy Res. 5, 124—136, (1934).
 - (7) Ch. Porcher, L'emploi du froid dans les industries laitières, Le Lait, 13, 1126—1140, (1933).
 - (8) S. Knudsen og M. Jensen, Nogle Undersøgelser over Smørrets Holdbarhed. De bakterielle Smørfejl's Paavisning og Opstaaen, Mælkeritidende 83, 1016—1039, (1930). id.: Quelques recherches sur la conservation du beurre, Le Lait, 13, 708—718, 885—904, (1933).
 - (8a) S. Knudsen, Ueber die Korrelation zwischen der Qualität und dem Katalasegehalt der Butter. Kgl. Vet.-og Landbohøjsk., København Aarsskrift 1935, 51—57.
 - (9) P. Osols, Beitrag zur Kenntnis der Katalase in Butter. Intern. Milchw. Kongr. Kopenhagen 1931, Ilte Abt., 97—103.
 - (10) K. J. Demeter and H. Christiansen, Die Katalaseprobe und die Brauchbarkeit bei der biologischen Bestimmung der Butterqualität. Intern. Milchw. Kongr. Rome—Mailand, 1934, Ilte Abt., D. 417—422.
 - (11) G. Cruess-Callaghan, The application of the catalasetest to butter, Sci. Proc. Roy. Dubl. Soc. 24, 253—255 (1935), (ref. Milchw. Forsch. 17, 353, 1935-36).
 - (12) G. Génin, Les problèmes de conservation dans l'industrie laitière, Le Lait, 13, 1046—1049 (1933).
 - (13) S. Orla-Jensen and N. C. Otte, The influence of refrigeration on the conservation of butter, Proc. Xth World's Dairy Congress, Rome—Milan, 1934, IInd Section, 519—529.
 - (14) R. Heiss und K. Engel, Untersuchungen über die Haltbarkeit von Butter, Milchw. Forsch. 17, 8—24, (1935-'36).
 - (15) W. Clayton, L'emploi et les effets du sel dans le beurre et la margarine, Le Lait 7, 913—927, (1927).
 - (16) S. Orla-Jensen, The Lactic Acid Bacteria, 1919, p. 36.
 - (17) T. Hof, Investigations concerning bacterial life in strong brines, Diss. Leiden, 1935.
 - (18) B. W. Hammer and M. A. Collins, The numbers of lipolytic bacteria in various dairy products, as determined with Nile-blue-sulphate. (Iowa State Agr. Exp. Sta. Res. Bull. 169, 1934).
 - (19) H. Macy, Quantitative changes in the microflora of butter during storage, J. Dairy Sc. 13, 266—272, (1930).

- (20) S. Shepard and H. C. Olson, What happens to butter stored at 32° F. *Nat. Butter and Cheese J.* **26**, nr. 18, 18—22, (1935).
 - (21) E. S. Guthrie, B. J. Scheib and C. N. Stark, The effect of certain factors upon the keeping quality of butter, *J. Dairy Sc.* **19**, 267—278, (1936).
 - (22) P. S. Arup and G. van B. Gilmour, *J. Saorstat Eireann Dept. Agr.* **32**, 273—276, (1933).
 - (23) M. Grimes and A. J. Hennerty, A study of the persistence of the *Escherichia-Aerobacter* Group in cold stored sweet cream salted butter, *Proc. Xth World's Dairy Congress, Rome-Milan, 1934* IInd Section, 53—54.
 - (24) M. Grimes and A. J. Hennerty, A study of the quantitative changes in the microbiological flora of sweet-cream-salted butter of good keeping quality, when held at 15° F. for a period of eight months, *J. Dairy Res.*, **5**, 137—144, (1934).
 - (25) J. A. Berry and C. A. Magoon, Growth of microorganisms at and below 0° C, *Phytopathology*, **24**, 780—796, (1934).
 - (26) H. Brunner, *Recherches comparatives sur différents procédés de conservation du beurre*, Intern. Milchw. Kongress, Rome-Mailand, 1934 *Le Lait*, **15**, 817—822, (1935).
 - (27) C. R. Barnicoat, Diacetyl in cold-stored butters, *J. Dairy Res.* **6**, 397—406, (1935).
 - (28) P. S. Arup and G. van B. Gilmour, Investigations to test bacteriologically and chemically the effect of cold storage on the keeping qualities of Irish Free State Creamery butter, *Journ. Dept. of Agric., Irish Free State* **31**, 179—189, (1932).
 - (29) O. Rahn, Ueber die Haltbarkeit der Butter, *Molkerei Ztg.* **43**, 1-4, (1929).
 - (30) M. Grimes, A study of the action of certain bacteria, yeasts and molds on the keeping quality of butter in cold storage, *J. Dairy Sc.* **6**, 427—445, (1923).
 - (31) B. W. Hammer and M. A. Collins, The numbers of lipolytic bacteria in various dairy products, as determined with Nile-blue-sulphate, (*Iowa State Agr. Sta. Res. Bull.* 169, 1934).
 - (32) G. Spitzer and E. H. Parfitt, A study of the proteolytic action of specific organisms and groups of organisms in butter made from graded cream, *J. Dairy Sc.* **12**, 1—20, (1929).
 - (33) M. Grimes, Facteurs influençant la conservation du beurre, *le Lait*, vol. Jubilaire Porcher, 1932, 1—8; (ref. *Zentralbl. f. Bakt.* II, **88**, 165, 1933).
-

TABEL VIII. Melkzuur bacteriën en totaal aantal bacteriën.

Vergelijking van de verse boters met de boters na 4 à 4½ maand bewaren in koelkelder + 2 dagen in boterkelder.

Bereiding:	Ongezouten						Gezouten						
	Versch			na 4 à 4½ maand koelkelder + 2 dagen boterkelder			No. proef	Versch			na 4 à 4½ maand koelkelder + 2 dagen boterkelder		
	aantal melkz. bact.	totaal aantal bact.	aantal melkz. bact.	totaal aantal bact.	smaak: (keuring)	aantal melkz. bact.		totaal aantal bact.	aantal melkz. bact.	totaal aantal bact.	smaak: (keuring)		
gewoon aangezuurd (± 7%) 10 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . . 5 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . . 2 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . . 1 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . . gewoon aangezuurd (± 7%)	5	1.880.000	3.300.000	80	2.280	vettig	11	140.000	200.000	60	5.300	vettig	
	3	< 10.000	20.000	100	5.300	goed ?	9	33.000	41.000	20	2.260	goed	
	4	< 10.000	< 10.000	< 100	1.100	zeer goed	10	6.100	6.600	10	2.430	goed, iets bijmaak	
	6	< 2.000	58.000	100	3.000	goed	12	5.600	5.800	10	3.700	goed	
	7	2.000	6.000	310	2.800	goed	13	5.000	5.300	10	188.000	goed	
	8	40.000	70.000	10	3.400	vettig	14	130.000	± 130.000	30	2.700	vettig	
	20	950.000	950.400	360	11.500	vettig	26	< 2.000	8.000	20	± 100.000	vettig	
	19	150.000	150.700	190	1.560	afwijkend	25	< 10.000	30.000	120	4.720	goed ?	
	18	810.000	820.500	180	10.580	iets afwijkend ?	24	< 10.000	30.000	10	7.900	goed	
	16	148.000	150.400	90	7.000	zeer goed	22	< 1.000	3.000	20	32.400	goed	
	15	± 120.000	± 125.000	140	14.900	goed	21	< 1.000	2.000	40	3.240	goed	
	17	560.000	560.900	40	10.300	vettig	23	12.000	12.900	70	1.600	vettig	
	Kolom No. 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Voor het aantal melkzuurbacteriën is telkens het hoogste aantal opgegeven, gevonden uit de beide Chinblauw-lactose agar platen.

De opgegeven totale aantallen bacteriën zijn de hoogste, welke met één van de gebruikte voedingsbodems werden gevonden; zoo noodig werden deze aantallen gevormd door optelling van het aantal melkzuurbacteriën (kolommen 6 en 8 in Tabellen IV—VII) met het aantal niet-melkzuur bacteriën (kolommen 7, 9 en 10 in Tabellen IV—VII).

Vergelijking van de verse boters met de boters na 4 à 4½ maand bewaren in koelkelder + 16 dagen in boterkelder.

Bereiding:	Ongezouten						Gezouten						
	Versch			na 4 à 4½ maand koelkelder + 16 dagen boterkelder			No. proef	Versch			na 4 à 4½ maand koelkelder + 16 dagen boterkelder		
	aantal melkz. bact.	totaal aantal bact.	aantal melkz. bact.	totaal aantal bact.	smaak: (keuring)	aantal melkz. bact.		totaal aantal bact.	aantal melkz. bact.	totaal aantal bact.	smaak: (keuring)		
gewoon aangezuurd (± 7%)	5	1.880.000	3.300.000	2.600	11.600	vettig	11	140.000	200.000	< 100	30.000	spekkig	
	3	< 10.000	20.000	15.000	± 6.000.000	goed	9	33.000	41.000	8.400	91.000	iets bijmaak	
	4	< 10.000	< 10.000	4.800	1.185.000	zeer goed	10	6.100	6.600	2.500	1.203.000	bijmaak	
	6	< 2.000	58.000		± 3.000.000	goed	12	5.800	5.800	1.000	194.000	goed	
	7	2.000	6.000	1.000	261.000	goed, iets voor	13	5.000	5.300	370	420.000	goed	
	8	40.000	70.000	4.200	15.000	vettig	14	130.000	± 130.000	100	9.000	vettig	
	20	950.000	950.400	2.300	132.300	vettig	26	< 2.000	8.000	150	23.150	spekkig	
	19	150.000	150.700	26.000	570.000	zeer goed	25	< 10.000	30.000	30.000	68.000	goed	
	18	810.000	820.500	2.300	± 600.000	goed ?	24	10.000	30.000	3.700	530.000	goed	
	16	148.000	150.400	± 33.000	260.000	goed	22	< 1.000	3.000	31.200	684.000	goed	
gewoon aangezuurd (± 7%)	15	± 120.000	± 125.000	170.000	1.600.000	goed	21	< 1.000	2.000	12.000	170.000	goed	
	17	560.000	560.900	900	18.000	vettig	23	12.000	12.900	430	2.800	spekkig	
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Kolom No. 1													

Voor het aantal melkzuurbacteriën is telkens het hoogste aantal opgegeven, gevonden uit de beide Chinablauw-lactose agar platen.

De opgegeven totale aantallen bacteriën zijn de hoogste, welke met één van de gebruikte voedingsbodems werden gevonden; zoo noodig werden deze aantallen gevormd door optelling van het aantal melkzuurbacteriën (kolommen 6 en 8 in Tabellen IV—VII) met het aantal niet-melkzuur bacteriën (kolommen 7, 9 en 10 in Tabellen IV—VII).

TABEL X. Verandering in het aantal **Melkzuurbacteriën** gedurende het verloop van de proef, uitgedrukt in procenten van het oorspronkelijke aantal in de versche boter;
Series bereid door toevoeging van zuursel vlak voor het karnen; gerangschikt naar afdalende hoeveelheid toegevoegd zuursel.

Bereiding:	No. proef	versch		na 2 maanden koelkelder		na 4 ½ md. koelk. %	na 4 ½ md. koelk. %	na 4 à 4 ½ mnd. koelk. + 2 dagen boterkelder		na 4 à 4 ½ mnd. koelk. + 16 dagen boterkelder	
		%	(aantal)	%	smaak:			%	smaak: (keuring)	%	smaak: (keuring)
gewoon aangezuurd ($\pm 7\%$)	ongezouten gezouten	5 11	100 (1.880.000)	0.106 1.43	goed iets vettig	— —	0.027 0.024	0.004 0.043	vettig vettig	0.122 0.07	vettig spekkig
10 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . .	ongezouten	3	100 (10.000)	40 ?	goed	—	60 ?	1.0	goed ?	150	goed
10 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . .	gezouten	9	100 (33.000)	0.61	iets afwijkend	—	0.30	0.060	goed	25	iets bijsmaak
5 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . .	ongezouten	4	100 (10.000)	2.0 ?	goed	—	30 ?	1.0 ?	zeer goed	48 ?	zeer goed
5 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . .	gezouten	10	100 (6.100)	18.0	iets afwijkend	5.0	5.0	0.16	goed, iets bijsmaak	41	bijsmaak
2 ½ % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . .	ongezouten	6	100 (2.000)	25.0 ?	goed	—	50 ?	5.0 ?	goed	?	goed
2 ½ % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . .	gezouten	12	100 (5.600)	230	goed	—	3.57	0.18	goed	17.9	goed
1 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . .	ongezouten	7	100 (2.000)	35	goed	—	5.0	15.5	goed	50	goed, iets goor
1 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . .	gezouten	13	100 (5.000)	24	goed	—	2.0	0.20	goed	7.4	goed
gewoon aangezuurd ($\pm 7\%$)	ongezouten gezouten	8 14	100 (40.000) 100 (130.000)	< 0.25 0.230	goed iets vettig	— 0.154	0.18 < 0.007	0.025 0.023	vettig vettig	10.5 0.077	vettig vettig
Kolom No. 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

In kolom 4 staan tusschen () bovendien aangegeven de werkelijke aantallen melkzuur bacteriën per cc boter.

Soms was het aantal melkzuur bacteriën in de versche boter niet met zekerheid bekend, doordat bij het onderzoek ervan een te kleine hoeveelheid boter werd gebruikt. Voor de berekening van het toename-percentage namen wij nu bij benadering aan, dat toch 1 kolonie op de telplaat was opgekomen. In dit geval is het berekende percentage dus te laag, om welke reden

Bereiding:		No. prof.	versch		na 2 maanden koelkelder		na 4 ½ mnd. koelk. %	na 4 à 4 ½ mnd. koelk.		na 4 à 4 ½ mnd. koelk.		na 4 à 4 ½ mnd. koelk.	
			%	(aantal)	%	smaak: (keuring)		%	smaak: (keuring)	%	smaak: (keuring)	%	smaak: (keuring)
gewoon aangezuurd ($\pm 7\%$)		20	100	(950.000)	0.021	goed	—	0.070	vettig	0.038	vettig	0.24	vettig
gewoon aangezuurd ($\pm 7\%$)		26	100	(2.000)	5.0 ?	iets vettig	—	6.5 ?	vettig	1.0 ?	vettig	7.5 ?	spekkig
5 % zuursel bij laatste waschwater . . .		19	100	(150.000)	0.73	afwijkend	—	0.027	afwijkend	0.13	afwijkend	17.3	zeer goed
5 % zuursel bij laatste waschwater . . .		25	100	(10.000)	1.0 ?	afwijkend	—	0.4 ?	goed ?	1.2 ?	goed ?	900 ?	goed
2 ½ % zuursel bij laatste waschwater . . .		18	100	(810.000)	0.605	goed	—	0.037	iets afwijkend ?	0.022	iets afwijkend ?	0.28	goed ?
1 % zuursel bij laatste waschwater . . .		24	100	(10.000)	<1.0	goed	—	0.50	goed	0.10	goed	37	goed
1 % zuursel bij laatste waschwater . . .		16	100	(148.000)	0.88	goed	—	<0.7	zeer goed	0.061	zeer goed	22	goed
1 % zuursel bij laatste waschwater . . .		22	100	(1.000)	90 ?	goed	—	20 ?	goed	2.0 ?	goed	3120 ?	goed
½ % zuursel bij laatste waschwater . . .		15	100	(120.000)	2.7	goed	—	0.083	goed	0.12	goed	141	goed
½ % zuursel bij laatste waschwater . . .		21	100	(1.000)	120 ?	goed	—	18 ?	goed	4.0 ?	goed	1200 ?	goed
gewoon aangezuurd ($\pm 7\%$)		17	100	(360.000)	0.14	goed	—	0.054	vettig	0.71	vettig	0.16	vettig
gewoon aangezuurd ($\pm 7\%$)		23	100	(12.000)	5.0	iets vettig	—	0.83	vettig	0.58	vettig	3.6	spekkig
Kolom No. 1		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		

In kolom 4 staan tusschen () bovendien aangegeven de werkelijke aantallen melkzuur bacteriën per cc boter.

Soms was het aantal melkzuur bacteriën in de versche boter niet met zekerheid bekend, doordat bij het onderzoek ervan een te kleine hoeveelheid boter werd gebruikt. Voor de berekening van het toename-percentage namen wij nu bij benadering aan, dat toch 1 kolonie op de telplaat was opgekomen. In dit geval is het berekende percentage dus te laag, om welke reden wij er in de Tabel een ? teken achter hebben geplaatst.

TABEL XII. Verandering in het totale aantal bacteriën gedurende het verloop van de proef, uitgedrukt in procenten van het oorspronkelijke aantal in de verse boter.

Series bereid door toevoeging van zuursel vlak voor het karnen; gerangschikt naar afdalende hoeveelheid toegevoegd zuursel.

Bereiding:		No. proef	versch		na 2 maanden koelkelder		na 3 1/2 mnd. koelk. %	na 4 1/2 mnd. koelk. %	na 4 à 4 1/2 mnd. + 2 dagen boterkelder		na 4 à 4 1/2 mnd. + 16 dagen boterkelder	
			%	(aantal)	%	smaak:			%	smaak: (keuring)	%	smaak: (keuring)
gewoon aangezuurd (± 7%)		ongezouten	5 100 (3.300.000)	0.47	goed	—	0.049	0.069	vettig	0.35	vettig	
gewoon aangezuurd (± 7%)		gezouten	11 100 (200.000)	1.05	iets vettig	—	1.9	2.7	vettig	15	spektig	
10 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . .		ongezouten	3 100 (20.000)	24	goed	—	71	28.0	goed ?	30.000	goed	
10 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . .		gezouten	9 100 (41.000)	36	iets afwijkend	—	7.6	5.5	goed	222	iets bijmaak	
5 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . .		ongezouten	4 100 (10.000)	81 ?	goed	80 ?	80 ?	11 ?	zeer goed	11850 ?	zeer goed	
5 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . .		gezouten	10 100 (6.600)	79	iets afwijkend	47	70	37	goed, iets bijmaak	18 200	bijmaak	
2 1/2 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . .		ongezouten	6 100 (58.000)	7.8	goed	—	16	5.2	goed	5.200	goed	
2 1/2 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . .		gezouten	12 100 (5.800)	800	goed	—	38	64	goed	3.340	goed	
1 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . .		ongezouten	7 100 (6.000)	45	goed	—	40	47	goed	4.300	goed, iets goor	
1 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . .		gezouten	13 100 (5.300)	220	goed	435	68	3550	goed	7.900	goed	
gewoon aangezuurd (± 7%)		ongezouten	8 100 (70.000)	0.86	goed	—	2.1	4.9	vettig	21	vettig	
gewoon aangezuurd (± 7%)		gezouten	14 100 (130.000)	2.8	iets vettig	—	1.2	2.1	vettig	6.9	vettig	
Kolom No. 1		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

In kolom 4 staan tusschen () bovendien aangegeven de werkelijke totale aantallen bacteriën per cc boter.

Soms was het totale aantal bacteriën in de verse boter niet met zekerheid bekend, doordat bij het onderzoek ervan een te kleine hoeveelheid boter werd gebruikt. Voor de berekening van het toename-percentage namen wij nu bij benadering aan, dat toch 1 kolonie op de telplaat was opgekomen. In dit geval is het berekende percentage dus te laag, om welke reden wij

Series bereid door toevoeging van zuursel vlak voor het karnen; gerangschikt naar afdalende hoeveelheid toegevoegd zuursel.

Bereiding:	No. proef	versch % (aantal)	na 2 maanden koelkelder		na 3 d. % na 4 d. %	na 4 ½ mnd. koelk. %	na 4 à 4 ½ mnd. koelk. + 2 dagen boterkelder		na 4 à 4 ½ mnd. koelk. + 16 dagen boterkelder	
			%	smaak:			%	smaak: (keuring)	%	smaak: (keuring)
gewoon aangezuurd (± 7%)	ongezouten	20 100 (950.400)	0.33	goed	—	0.51	vettig	13.9	vettig	
gewoon aangezuurd (± 7%)	gezouten	26 100 (8.000)	26	iets vettig	—	425	vettig	289	spekkig	
5 % zuursel bij laatste waschwater . . .	ongezouten	19 100 (150.700)	2.7	iets afwijkend	—	1.42	afwijkend	380	zeer goed	
5 % zuursel bij laatste waschwater . . .	gezouten	25 100 (30.000)	6,0	iets afwijkend	—	11.3	goed ?	227	goed	
2 ½ % zuursel bij laatste waschwater . . .	ongezouten	18 100 (820.500)	1.89	goed	—	0.76	iets afwijkend	73	goed ?	
2 ½ % zuursel bij laatste waschwater . . .	gezouten	24 100 (30.000)	5.0	goed	—	10.7	goed	1770	goed	
1 % zuursel bij laatste waschwater . . .	ongezouten	16 100 (150.400)	2.8	goed	—	3.7	zeer goed	173	goed	
1 % zuursel bij laatste waschwater . . .	gezouten	22 100 (3.000)	1000	goed	—	100	goed	22800	goed	
½ % zuursel bij laatste waschwater . . .	ongezouten	15 100 (125.000)	11.6	goed	—	3.2	goed	1290	goed	
½ % zuursel bij laatste waschwater . . .	gezouten	21 100 (2.000)	1745	goed	—	290	goed	8500	goed	
gewoon aangezuurd (± 7%)	ongezouten	17 100 (560.900)	0.68	goed	—	0.52	vettig	3.3	vettig	
gewoon aangezuurd (± 7%)	gezouten	23 100 (12.900)	23	iets vettig	—	28	vettig	22	spekkig	
Kolom No. 1	2	4	5	6	7	8	9	10	11	12

In kolom 4 staan tusschen () bovendien aangegeven de werkelijke totale aantallen bacteriën per cc. boter.

Soms was het totale aantal bacteriën in de versche boter niet met zekerheid bekend, doordat bij het onderzoek ervan een te kleine hoeveelheid boter werd gebruikt. Voor de berekening van het toename-percentage namen wij nu bij benadering aan, dat toch 1 kolonie op de telplaat was opgekomen. In dit geval is het berekende percentage dus te laag, om welke reden wij er in de Tabel een ? tekenen achter hebben geplaatst.

TABEL XIV. Verandering van het aantal gisten in de boter gedurende het verloop van de proef.

Series bereid door toevoeging van zuursel vlak voor het karnen; gerangschikt naar afdalende hoeveelheid toegevoegd zuursel.

Bereiding:	No. proef	Versch	na 2 mnd. koelkelder		Na 3 à 3½ mnd. koelk.	Na 4 à 4½ mnd. koelk.	Na 4 à 4½ mnd. koelk. + 2 dagen boterkelder		Na 4 à 4½ mnd. koelk. + 16 dagen boterkelder	
			aant.	smaak			aantal	smaak (keuring)	aantal	smaak (keuring)
gewoon aangezuurd ($\pm 7\%$)	5	1	0	goed	—	0	3	vettig	0	vettig
gewoon aangezuurd ($\pm 7\%$)	11	2	2	iets vettig	0	0	3	vettig	± 1500	spekkig
10 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd	3	0	0	goed	—	0	29	goed ?	4	goed
10 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd	9	2	187	iets afwijkend	6	0	1	goed	7000	iets bijsmaak
5 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd	4	0	0	goed	0	0	2	zeer goed	< 100	zeer goed
5 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd	10	2	7	iets afwijkend	—	0	0	goed, iets bijsmaak	3200	bijsmaak
2½ % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd	6	0	0 ?	goed	—	0	5	goed	100	goed
2½ % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd	12	2	186	goed	—	0	12	goed	12300	goed
1 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd	7	0	0	goed	—	0	3	goed	86	goed, iets spakking
1 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd	13	3	0	goed	—	0	1	goed	1700	goed
gewoon aangezuurd ($\pm 7\%$)	8	5	0	goed	—	0	1	vettig	600	vettig
gewoon aangezuurd ($\pm 7\%$)	14	2	2	iets vettig	118	0	2	vettig	800	vettig
Kolom No. 1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

TABEL XV. Verandering van het aantal gisten in de boter gedurende het verloop van de proef.
 Series bereid door toevoeging van zuursel in het laatste waschwater; gerangschikt naar afdalende hoeveelheid toegevoegd zuursel.

Bereiding:		No. proef	Versch	na 2 mnd. koelkelder		Na 3 à 3½ mnd. koelk.	Na 4 à 4½ mnd. koelk.	Na 4 à 4½ mnd. koelk. + 2 dagen boterkelder		Na 4 à 4½ mnd. koelkelder + 16 dagen boterkelder	
				aant.	smaak			aantal	smaak (keuring)	aantal	smaak (keuring)
gewoon aangezuurd (± 7 %)	ongezouten	20	15	173	goed	—	0	0	vettig	500	vettig
gewoon aangezuurd (± 7 %)	gezouten	26	5	8	iets vettig	—	0	3	vettig	8600	spekkig
5 % zuursel bij laatste waschwater	ongezouten	19	0	0	iets afwijkend	—	0	0	afwijkend	200	zeer goed
5 % zuursel bij laatste waschwater	gezouten	25	3	0	iets afwijkend	—	0	1	goed ?	20	goed
2½ % zuursel bij laatste waschwater	ongezouten	18	40	± 750	goed	470	0	15	iets afwijkend ?	1010	goed ?
2½ % zuursel bij laatste waschwater	gezouten	24	4	6	goed	—	3	6	goed	4400	goed
1 % zuursel bij laatste waschwater	ongezouten	16	2	19	goed	—	0	7	zeer goed	200	goed
1 % zuursel bij laatste waschwater	gezouten	22	12	14	goed	—	0	1	goed	± 13.000	goed
½ % zuursel bij laatste waschwater	ongezouten	15	16	± 450	goed	± 2000	0	106	goed	54.000	goed
½ % zuursel bij laatste waschwater	gezouten	21	3	0	goed	—	2	0	goed	140	goed
gewoon aangezuurd (± 7 %)	ongezouten	17	5	0	goed	—	0	4	vettig	15	vettig
gewoon aangezuurd (± 7 %)	gezouten	23	3	0	iets vettig	—	0	0	vettig	40	spekkig
Kolom No. 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

TABEL XVI. Verandering in het aantal Eiwitsplitsende bacteriën gedurende het verloop van de proef, uitgedrukt in procenten van het oorspronkelijk aantal in de verse biter.

Series bereid door toevoeging van zuursel vlak voor het karnen; gerangschikt naar aftalende hoeveelheid toegevoegd zuursel.

Bereiding:		No. proef	Versch		Na 2 maanden koelkelder		Na 3 à 3½ mnd. koelk. %	Na 4 à 4½ mnd. koelk. %	Na 4 à 4½ mnd. koelk. + 2 dagen boterkelder		Na 4 à 4½ mnd. koelk. + 16 dag. boterkelder	
			%	(aantal)	%	smaak			%	smaak : (keuring)	%	smaak : (keuring)
gewoon aangezuurd (± 7 %) gewoon aangezuurd (± 7 %) 10 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . . . 10 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . . . 5 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . . . 5 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . . . 2½ % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . . . 2½ % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . . . 1 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . . . 1 % zuursel vlak voor het karnen toegevoegd . . . gewoon aangezuurd (± 7 %) gewoon aangezuurd (± 7 %)	ongezouten	5	100 (500)	200	goed	—	14	80	vettig	600	vettig	
	gezouten	11	100 (1200)	67	iets vettig	—	50	42	vettig	167	spekkig	
	ongezouten	3	100 (900)	56	goed	—	56	67	goed	?	goed	
	gezouten	9	100 (300)	33	iets afwijk.	—	67	33	goed	667	iets bijsmaak	
	ongezouten	4	100 (100)	900	goed	400	200	300	zeer goed	?	zeer goed	
	gezouten	10	100 (200)	650	iets afwijk.	250	200	100	goed, iets bijsmaak	?	bijsmaak	
	ongezouten	6	100 (100)	100	goed	—	200	100	goed	?	goed	
	gezouten	12	100 (100)	2100	goed	—	140	200	goed	300	goed	
	ongezouten	7	100 (60)	167	goed	—	167	167	goed	± 13.000	goed, iets goor	
	gezouten	13	100 (200)	150	goed	—	100	45	goed	19.000	goed	
	ongezouten	8	100 (400)	75	goed	—	50	138	vettig	500	vettig	
	gezouten	14	100 (100)	600	iets vettig	—	200	120	vettig	200	vettig	
	Kolom No. 1		2	4	5	6	7	8	9	10	11	12

In kolom 4 staan tusschen () bovendien aangegeven de werkelijke aantallen etwitsplitsende bacteriën per cc biter.

De vraagteekens in kolom 11 beteekenen dat het aantal eiwitsplitsende bacteriën niet precies bekend is, doordat op de betreffende telplaten te veel eiwitsplitsende bacteriën-koloniën waren opgekomen, zoodat de plaat geheel helder was geworden.

Bereiding:		No. proef	Versch		Na 2 maanden koelkelder		Na 3 à 3½ mnd. koelk. %	Na 4 à 4½ mnd. koelk. %	Na 4 à 4½ mnd. koelk. + 2 dagen boterkelder		Na 4 à 4½ mnd. koelk. + 16 dag. boterkelder	
			%	(aantal)	%	smaak			%	smaak: (keuring)	%	smaak: (keuring)
Bereiding:	ongezouten	20	100	(200)	<50	goed	50	150	25	vettig	?	vettig
	gezouten	26	100	(1100)	18	iets vettig	—	36	27	vettig	9	spekkig
	5 % zuursel bij laatste waschwater	19	100	(100)	300	iets afwijk.	—	100	60	afwijkend	91.000	zeer goed
	5 % zuursel bij laatste waschwater	25	100	(300)	67	iets afwijk.	—	67	70	goed ?	2.100	goed
	2½ % zuursel bij laatste waschwater	18	100	(300)	100	goed	—	133	100	iets afwijkend?	39.000	goed ?
	2½ % zuursel bij laatste waschwater	24	100	(100)	300	goed	—	300	180	goed	100	goed
	1 % zuursel bij laatste waschwater	16	100	(100)	600	goed	—	400	300	zeer goed	31.000	goed
	1 % zuursel bij laatste waschwater	22	100	(300)	100	goed	—	133	50	goed	1.300	goed
	½ % zuursel bij laatste waschwater	15	100	(100)	2100	goed	14.000	100	400	goed	146.000	goed
	½ % zuursel bij laatste waschwater	21	100	(60)	1667	goed	—	333	333	goed	13.000	goed
	gewoon aangezuurd (± 7 %)	17	100	(300)	67	goed	—	33	7	vettig	<33	vettig
	gewoon aangezuurd (± 7 %)	23	100	(100)	500	iets vettig	—	200	300	vettig	<100	spekkig
	Kolom No. 1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

In kolom 4 staan tusschen () bovendien aangegeven de werkelijke aantallen eiwitplitsende bacteriën per cc boter.

Het vraagteeken in kolom 11 beteekent dat het aantal eiwitplitsende bacteriën niet precies bekend is, doordat op de betreffende telplaat te veel eiwit-splitsende bacteriën-kolonies waren opgekomen, zoodat de plaat geheel helder was geworden.

Wel kan dus worden aangenomen dat het bijbehorende percentage **hoog** is.

TABEL XVIII. Vergelijking van het aantal eiwitsplitsende bacteriën in de gepasteuriseerde room en de **versche daaruit bereide boter**; benevens het **totaal aantal** bacteriën op dezelfde voedingsbodem (caseïne-agar) gevonden.

No. proef	Totaal aantal bacteriën, waarvan eiwitsplitters:				
	room/cc	boter/cc	room/cc	boter/cc	
5	920	1400	95	500	Vergelijk Tabel XVI.
11	1500	1800	650	1200	
3	2040	1900	90	900	
9	90	600	20	300	
4	2170	400	135	100	
10	300	500	180	200	
6	550	2500	20	100	
12	150	200	20	100	
7	160	1900	5	60	
13	50	300	0	200	
8	340	3200	30	400	
14	210	300	130	100	
20	± 300	400	50	200	Vergelijk Tabel XVII.
26	—	3900	—	1100	
19	20	700	10	100	
25	—	900	—	300	
18	20	10500	0	300	
24	—	900	—	100	
16	50	2400	10	100	
22	50	1100	0	300	
15	50	5200	30	100	
21	30	200	0	60	
17	100	900	50	300	
23	170	900	40	100	

TABEL XIX. Vergelijking van de aanwezigheid van **coli-bacteriën** (× teekens) en andere **gasvormers** (+ teekens) in gepasteuriseerde room en de daaruit bereide **versche** boter. (— teeken: geen gasvorming opgetreden in de betreffende Einhorn.)

No.	room			boter			
volume in cc.	10	1.0	1.0	10	1.0	0.1	0.01
3	}		niet onderzocht	×	×	—	
4				×	—	—	
5*)				×	+	—	
6				×	×	×	
7				×	×	—	
8	×	—		—			
9	—	—		—			
10	×	×		—			
11	×	—		—			
12	×	×		—			
13	×	—		—			
14	×	—		—			
15	±	—		×	+		
16	×	×		×	×		
17	×	—		×	—	×	
18	×	—	—	×	×		
19	—	—	—	+	—		
20	×	×	—	×	—	—	
21	×	×	—		×	—	—
22	×	×	—	×	—	—	—
23	×	×	—	×	—	—	—
24	×	—	—	×	—	—	—
25	×	×	—	×	×	—	—
26	×	×	×	×	—	—	—

*) De vet gedrukte nummers der proeven zijn die van boter bereid uit normaal aangezuurde room.

TABEL XX. Bij de keuringen aan de boter waargenomen schimmelontwikkeling.

Bereiding:	Ongezouten					Gezouten						
	No. proef	Gewone keuring der versche boter te Amsterdam			Keuring koelhuis-boter 1) + 16 dagen boterkelder	No. proef	Gewone keuring der versche boter te Amsterdam			Keuring koelhuis-boter 1) + 16 dagen boterkelder		
		I	II	III	boven		aan kanten	I	II	III	boven	aan kanten
extra vette room												
2 uur voor het karnen												
45 % zuursel toegevoegd .	1	—	—	niet gekeurd	iets sch.	iets sch.	11	—	niet gekeurd	—	—	—
gewoon aangezuurd;	2	—	—		—	iets sch.	9	—		—	—	—
vóór het karnen 140 kg. ijs	5	—	—	—	—	10	—	schimmel		—	—	
ijs toegevoegd	3	—	—	schimmel	—	12	—	—		—	—	
gewoon aangezuurd (± 7%)	4	—	—	schimmel	—	13	—	—	—	—		
10 % zuursel vlak voor het	6	—	—	schimmel	—	14	—	—	—	—		
karnen toegevoegd	7	—	—	schimmel	—	26	—	—	—	—		
5 % zuursel vlak voor het	8	—	—	—	—	25	—	—	—	—		
karnen toegevoegd	20	—	—	niet gekeurd	—	24	—	—	—	—		
gewoon aangezuurd (± 7%)	19	—	veel sch.		iets sch.	iets sch.	22	—	—	—	—	
gewoon aangezuurd (± 7%)	18	veel sch.	zeer veel schimmel	niet gekeurd	iets sch.	iets sch.	21	—	—	—		
5 % zuursel vlak voor het	16	iets sch.	veel sch.		—	—	23	—	—	—	—	
karnen toegevoegd	15	iets sch.	veel sch.	—	—	—	—	—	—	—		
2½ % zuursel vlak voor het	17	—	—	enkele sch.	—	—	—	—	—	—		
karnen toegevoegd												
1 % zuursel vlak voor het												
karnen toegevoegd												
½ % zuursel vlak voor het												
karnen toegevoegd												
gewoon aangezuurd (± 7%)												
Kolom No. 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Een onderzoek van het water Rawa-Pening als badwater in verband met eventueele typhus, dysenterie en leptospirosis infectie

DOOR

Dr. M. SARDJITO, Dr. A. MOCHTAR en R. WIRASMO.

Semarang.

De Rawa-Pening wordt gevormd door waterplassen, die gelegen zijn in een kom, zich bevindende tusschen de plaatsen Salatiga en Ambarawa in de Residentie Semarang, in Midden-Java. Ten Noorden is de kom begrensd door den berg Oengaran, ten Zuiden door den berg Telemojo met de voorbergen Kendil en Gadjahmoengkoer. Ten Westen en Oosten wordt zij afgesloten door de heuvels als uitloopers der genoemde bergen.

De Rawa-Pening wordt gevoed door de rivieren en stroompjes, afkomstig van de hellingen van de bergen Oengaran en Telemojo. Er is slechts één afvoerweg van het water, welke gevormd wordt door de rivier Toentang.

Het grootste gedeelte van de kom is in den loop der eeuwen reeds aangeslibd tot een vruchtbare vlakte. Slechts een klein middendeel daarvan bevat de waterplassen. Bij een gemiddelde waterstand van 461.30 M. (Semarang peil) heeft de Rawa-Pening volgens een rapport van den dienst der Binnenvisscherij een oppervlak van 9,6 KM². Een uitgestrekt gedeelte van het wateroppervlak is bedekt met waterhyacinthen (*Echornea*) en andere plantjes, waaraan het ontstaan van de drijvende rijstvelden te danken is, waarover hier, hoe belangrijk het hydrobiologisch proces ook moge zijn, niet nader uitgeweid kan worden.

De Rawa-Pening vormt vaak het middelpunt van de belangstelling; nu eens van den kant van den Waterstaatsdienst,

dan van den Dienst der binnenvisscherij en niet te vergeten van den Dienst der Volksgezondheid.

In den laatsten tijd wordt onze aandacht getrokken door de groote animo van het beter gesitueerde deel van de Semarangse ingezetenen ten opzichte van deze waterplassen, van wege haar geschiktheid tot spelevaren.

Onmiddellijk is de gedachten associatie van elken hygiënist, die op de hoogte is van deze gang van zaken, gericht op de vraag of het water van de Rawa-Pening ziektekiemen herbergt, welke de gezondheid van de week-end en dagjesbezoekers zouden kunnen bedreigen.

I

Ten eerste hebben wij het oog op de zgn. water-borne-diseases zooals die van de typhus- en dysenterie-groep.

Hierbij hebben wij rekening te houden met het feit, dat de ziektekiemen van deze groep door de zieken en bacillendragers met de excreta, voornamelijk de ontlasting en de urine, worden uitgescheiden.

Mocht er gevaar voor deze ziekte te duchten zijn, dan zouden de ziektekiemen afkomstig moeten zijn van de bewoners van de dorpen welke Rawa-Pening omgeven.

Met de excreta, welke in de rivieren en slootjes geloosd worden, worden de eventueele aanwezige pathogene bacteriën door den stroom naar de Rawa-Pening getransporteerd. Hierbij zij ongemerkt, dat de ontlasting afkomstig van de gevangenis Banjoebiroe bij overbelasting van de septic-tank in de waterloop komt, die ze verder vervoert naar de bovengenoemde plassen.

Zooals bekend is, wordt als indicator voor de verontreiniging van het te onderzoeken water, de aanwezigheid van ontlasting-bacteriën met name de bac. coli gebruikt.

Een onderzoek hiernaar werd verricht. Watermonsters werden op verschillende plaatsen en diepten in de Rawa-Pening genomen; te beginnen op een plek ± 100 M. vóór de aanlegplaats der booten van de zeilvereeniging en vervolgens telkens ± 20 M. verder naar het midden van de waterplas.

De titratie is niet lager verricht dan 1 cc.

Het resultaat is als volgt.

No. monster water	Diepte	Hoe- danigheid	Kiemgetal	Eykman	Glucose	Lactose	Groei op Endo met metaalglans	Coli
I. ± 100 M. v. aanlegplaats	a.d. oppervlakte	opalescent	252	25+	1+	1+	+	in 25 cc+
II. ± 120 M. "	2 M. diep	id.	742	5+	1+	1+	+	in 25 cc+
III. ± 140 M. "	5 M. diep	vuil	520	1+	1+	1+	+	in 25 cc+
IV. ± 160 M. "	oppervlakte	fijne partikels	388	5+	1+	5+	+	in 25 cc+
V. ± 180 M. "	1½ M. diep	vuil	562	1+	1+	1+	—	in 25 cc—
VI. ± 200 M. "	10 M. diep	id.	744	1+	1+	1+	—	in 25 cc—

Uit het resultaat is af te leiden, dat het aantal gevonden bacteriën per cc. water aan de oppervlakte genomen kleiner is dan uit de diepere lagen.

De lage gistings-titer in Eykman-, glucose- en lactose-voedingsbodem wijst volgens Clemesha en Flu op faecale verontreiniging van recenten datum, vooral ook omdat er faecale colibacillen gevonden waren. Dat de faecale vervuiling naar het midden toe afneemt, mag afgeleid worden uit het feit, dat de watermonsters genomen op een afstand van 180—200 M. van den kant in een hoeveelheid van 25 cc geen colibacillen meer bevatten.

Ter vergelijking der resultaten halen wij het onderzoek van Flu aan, hetwelk werd verricht om na te gaan den graad van zuiverheid van het water uit het meer Tjiseroea bij Sindanglaja, dat in 1931 is leeg gelopen.

Het bacterie-getal per cc water aan de oppervlakte op 25 M. afstand van de inlaat bedroeg gemiddeld 320, op 5 M. diepte 552, terwijl het op 10 M. diepte 1700 bedroeg. Op 300 M. afstand van de inlaat waren de gevonden bacterie-getallen aan de oppervlakte, op 5 M. en 10 M. diepte, respectievelijk 270, 358 en 955. De colibacillen werden in alle onderzochte watermonsters door Flu aangetoond.

Bacteriologisch is het water van Rawa-Pening derhalve wel te vergelijken met dat van het toenmalige meer van Tjiseroea. Ook Flu heeft daar den invloed van de zelfreinigingsprocessen van het water geconstateerd.

Welke beteekenis kan water met de gevonden hoedanigheden hebben voor de personen, die er in baden?

Op grond van het bovenvermelde kan men aannemen, dat, waar colibacillen gevonden werden, de kans bestaat, dat het water ter plaatse nu en dan typhus- en dysenterie-bacillen bevat en wel in nog schaarscher verhouding dan het aantal colibacillen, omdat in de ontlasting afkomstig van de dorpsbevolking, welke grootendeels niet ziek is, veel meer colibacillen te vinden zijn dan pathogene microörganismen.

De kans op aanwezigheid van bacillen uit typhus- en dysenterie-groep en dus de infectiekans daarmee is, zooals volgt uit de coli-titer, in de buurt van den rand van de Rawa-Pening grooter dan 200 M. verder, in het midden van de watervlakte.

Het gevaar van de infectie dat vermoedelijk gering is, kan verder nog verminderd worden door de toepassing van prophylactisch typhus-dysenterie vaccin bij de bezoekers om het halfjaar. Hierbij dient vermeld te worden, dat het dysenterie vaccin een heftiger reactie kan geven dan het typhus vaccin.

II

Als tweede ziekte, die in aanmerking komt bij het bekijken van dit vraagstuk, dient de ziekte veroorzaakt door leptospiren genoemd te worden.

De rol van water in de epidemiologie van de leptospiren is zeer belangrijk.

In 1911 reeds hebben de Duitsche onderzoekers Hecker en Otto het feit geconstateerd, dat onder de soldaten, die in de rivier gezwommen hadden, de ziekte van Weil uitbrak, welke echter verdween na uitvaardiging van het verbod om in de rivier te zwemmen.

Bij de ontdekking van de leptospira icterohaemorrhagiae als verwekker van de ziekte van Weil konden de Japansche onderzoekers, Inada c.s. het verband tusschen de leptospirosis en het contact met besmet water nog duidelijker maken, doordat zij de diagnose bacteriologisch konden staven. Ze hebben waargenomen, dat de patiënten met deze ziekte onder de mijnwerkers gevonden werden, die veel in onder water staande gedeelten der mijnen moesten werken. Verder werd de ziekte

door hen ook geconstateerd bij de landbouwers, die de natte rijstvelden bewerkten.

Door het werk van Schüffner en zijn medewerkers, tevens door dat van Kramer en van Romijn, wordt de beteekenis van het baden in verdachte wateren en van een onvrijwillig contact met grachtwater ten gevolge van een ongeluk, voor het tot stand komen van de ziekte van Weil in Nederland verduidelijkt. Ook is gebleken dat de infectie-dichtheid in de provincies Zuid- en Noord-Holland het grootst is.

In Oost-Europa beschreef Kathe „een leptospirosis epidemie, door hem „Schlammfieber” genoemd, die uitsluitend na overstromingen optreedt.

Dat het water van de Theems ook een infectiegevaar kan vormen, heeft Manson-Bahr met zijn beschreven geval van Weilsche ziekte aannemelijk gemaakt.

De gevallen bij Rheims zouden volgens Railliet het gevolg zijn van het baden in de rivier Vesle.

Jorge beschreef een epidemie in Lissabon, veroorzaakt door het drinken van water uit een bepaalde bron.

In de tropen zijn ook mededeelingen verschenen van leptospira-infecties door contact met water.

Baermann en Zuelzer schreven de leptospira-endemieën onder de arbeiders van de onderneming Sarang Gitting toe, aan het baden der menschen in de rivier.

Ook op de Andamans-eilanden is een leptospirosis epidemie door Taylor en Goyle beschreven, welke heerschte onder de arbeiders, die in den natten bodem of in het water moesten werken.

Bessem constateerde 2 gevallen van de ziekte van Weil, ten gevolge van het zwemmen in een zwembad in Pemangkat (Wester Afd. Borneo), waarvoor het water ongedesinfecteerd betrokken werd uit een groote wadoek (waterreservoir door een dalafdamming).

Proefondervindelijk heeft Buchanan aangetoond, dat een cavia intraperitoneaal geënt met de slijmachtige massa afkomstig van de wand van een steenkoolmijn in Schotland, na eenige dagen aan de ziekte van Weil ging lijden.

Appelman toonde op een elegante manier aan, dat in het grachtwater van Leiden virulente leptospiren leven. Het gelukte hem de infectie bij caviae tot stand te brengen, door de dieren

eerst aan de buikhuid te scheren en te scarificeeren en daarna in 't verdachte, te onderzoeken water, gedurende een uur te baden.

Hier zij slechts aangestipt, dat volgens schüffner, van Thiel en andere onderzoekers, de ziektekiemen, welke zich in het water bevinden, afkomstig moeten zijn van leptospirendragers zooals menschen, ratten en mogelijk nog andere dieren.

De meening van Baermann en Zuelzer, die de waterinfectie verklaren door aan te nemen, dat de saprophytisch in het water levende waterleptospiren (*spirochaeta pseudo-interogenes* Uhlenhuth-Zuelzer) overgaan in pathogene leptospiren, moet nog met klemmender bewijzen gestaafd worden, voordat zij ingang zou kunnen vinden bij andere onderzoekers.

Al heeft één van ons (S.) het door zijn proeven waarschijnlijk kunnen maken, dat de ratten-leptospira apathogeen kan worden met verandering van antigene en andere eigenschappen, gelijkende op die der waterleptospiren, dit impliceert nog niet de mogelijkheid, dat waterleptospiren zoo gemakkelijk kunnen overgaan in pathogene soorten, dat ze endemieën kunnen verwekken. De genomen proeven kunnen wel van belang zijn voor ons inzicht in de phylogenie dezer microörganismen.

Ten einde te kunnen oordeelen over de kans van het oploopen van leptospirosis als eventueel gevolg van het baden in de Rawa-Pening, dient op grond van het bovenvermelde, onderzocht te worden:

- a. of het water een geschikt milieu kan vormen voor de leptospira;
- b. of deze spirochaeten in de ratten, gevangen in de buurt van Rawa-Pening gevonden zullen worden.

a. Onder de vele factoren, die op het leven der leptospiren in het water begunstigend werken, is de pH van het water wel de belangrijkste.

Een aanwijzing hiervoor was de waarneming van Ido en medewerkers, die in 1917 geconstateerd hebben, dat het bodemwater in de mijnen, waar vele leptospirosis-gevallen onder de mijnwerkers voorkwamen, alkalisch reageerde, terwijl daar, waar het grondwater zure reactie vertoonde, heel weinig ziekte-gevallen gevonden werden (cit. Buchanan).

Uhlenhuth en Zuelzer (1920) hebben bij hun onderzoekingen op de *spirochaeta pseudoicterogenes* er reeds op gewezen dat

voor deze microörganismen een lichte alkalische reactie van het milieu van belang is.

De gunstige werking van de alkalische reactie van het water zoowel op de pathogene als op de apathogene leptospiren is daarmede aannemelijk gemaakt.

Dit wordt bevestigd door het uitgebreid onderzoek van Buchanan in Schotland.

Zuelzer en een onzer (S.) hebben in 1928 de beteekenis van de p_H van het water in tropische streken nog eens naar voren gebracht op grond van het feit dat daar, waar het natuurwater alkalisch is, zooals op de Oostkust van Sumatra, veel leptospirosis gevallen voorkomen en in tegenstelling daarmede zagen wij in Batavia, waar het water zuur reageerde, dat daar heel zelden leptospirosis geconstateerd werd, ondanks dat 17 % der rioolratten van Batavia, dragers zijn van pathogene leptospiren. Bij dit onderzoek deelden wij ook mede, dat het water van Semarang en omgeving alkalisch was.

Als bevestiging van de juistheid van de p_H van het water als aanwijzing, dat de daar eventueel voorkomende pathogene leptospiren infecties teweeg kunnen brengen, publiceerde een onzer (M.) 9 gevallen van leptospirosis, verzameld in 1 jaar tijd, die in de C.B.Z. Semarang behandeld werden. Dit aantal vormt wel een groote tegenstelling met Batavia, waar in 8 jaren tijd slechts 3 ziektegevallen voorkwamen.

Slot en van der Walle, die een studie maakten van de epidemiologie der leptospirosis in Bangkinang (Midden Sumatra), hebben gevonden dat de p_H van verschillende plassen in Bangkinang zou overeenkomen met die van Batavia, zoodat ze deze factor niet kunnen gebruiken voor het verklaren van het voorkomen van leptospirosis in die streek. Toch meenen wij te mogen opmerken, dat het water van de ter plaatse stroomende Kampar kanan volgens hen vaak zwak alkalisch (p_H 7—7.6) was, terwijl het Tjiliwoengwater in Batavia steeds zuur (p_H 6.2—6.4) reageerde, waardoor een verschil in hydrobiologische processen in de beide rivieren en haar onmiddellijke omgeving wel verwacht kan worden.

De publicatie van Taylor en Goyke heeft aangetoond, dat in streken op de Andaman eilanden, waar de p_H van het water varieerde van 6.9 tot 7.6, in zeven maanden tijd 64 gevallen van leptospirosis voorkwamen, terwijl in gebieden, waar het

water slechts P_H 6.6 aanwees, geen leptospirosis voorkwam.

Naar aanleiding van de p_H uitkomsten (7.9—9.9) van de wateren in Denemarken, verder nog gesteund door het bio-coenose onderzoek, kwam Zuelzer tot de conclusie dat in het water in Denemarken geschikte voorwaarden aanwezig zijn voor het gedeiën van leptospiren zoowel van de pathogene, als van de saprophytische soorten.

Op bovengenoemde gronden worden door ons de p_H bepalingen verricht. De reactie van het water van de naar Rawa-Pening toestroomende rivieren en slootjes in den sector Banjoe-Biroe en de badplaats Moentjoel en wel in den Zuid-Westelijken hoek is, behalve bij één enkele bron, overal alkalisch. Ook het water van Rawa-Pening zelf heeft op verschillende plaatsen tusschen het clubhuis van de zeil-roeivereniging en het boothuis van den Dienst der Binnenvisscherij een p_H van 7.6.

De gevonden p_H van het water der rivieren en van Rawa-Pening dd. 19-8-1936 was:

Kaligaleh	p_H 7,8
Kali Zijsloot	„ 7,7
Kali Klegoeng voor 2de kl. school	„ 7,5
Kali achter gevangenis Banjoebiroe	„ 7,6
Sawah naast rawah	„ 7,7
Rawa-Pening op verschillende plaatsen	„ 7,6
Kali bij brug Sentoel	„ 7,7
Bron naast idem	„ 6,9
Samenvloeiing vorige wateren	„ 7,2
Kali Semah	„ 7.
Brug Kaligilang	„ 7,4
Kali Legi	„ 7,7

De temperatuur van het water van Rawa-Pening op 10 December 1936 om 11 uur v.m. was 29° . Na NaCl gehalte van het water was 8 mgr. per Liter, een hoeveelheid, die volgens Schüffner en Ruys nog niet storend werkt op het leven van deze microörganismen.

Op grond van de uitkomsten van het onderzoek van de p_H , de temperatuur en het zoutgehalte, kan men de gevolgtrekking maken, dat het water wel geschikt kan zijn voor het in standhouden van leptospiren.

b. De noodzakelijkheid van het onderzoek naar leptospiren-dragers onder de rattenbevolking in de onmiddellijke omgeving van Rawa-Pening is boven reeds gemotiveerd. Voor ons doel is van belang die soort ratten te vangen en te onderzoeken, waarvan aangenomen mag worden, dat zij in nauw contact verkeerden met de uitgebreide watervlakten. Ons onderzoek is dan ook hoofdzakelijk gericht op de in de sawah, onmiddellijk grenzende aan het moeras, levende rattenbevolking. Door het uitzetten van vallen op de sawah's op verschillende punten om de rawa, hebben wij veldratten (*Rattus rattus brevicaudatus*) en enkele huisratten (*Rattus rattus diardii*) levend kunnen vangen. Rioolratten (*Mus decumanus*) werden in de vallen niet aangetroffen.

Reeds in het begin stadium van ons onderzoek komen wij tot het interessante vraagstuk n.l. het zoeken van leptospiren-dragers onder de veldratten. Dat de rioolratten algemeen bekend staan als dragers van de Weil-leptospiren is in verschillende landen vastgesteld. Wanneer wij de vondsten van vele bekende onderzoekers nagaan, dan blijkt het ook, dat het percentage van de „dragere” onder de rioolratten zeer hoog kan zijn, varieerende van 0 tot 85 %. Het is hier niet de plaats de vondsten van de vele onderzoekers te vermelden. Een ieder, die belangstelt in de resultaten van het ratten onderzoek, verricht in verschillende steden in het buitenland, zij korthedshalve verwezen, naar de lijst van namen vervat in het handboek der pathogene Micro-organismen van Kolle en Wassermann (Afl. 41. 1930)

Mededeelingen over onderzoekingen op veldratten (*R. rattus brevicaudatus*) zijn er in de literatuur weinig bekend, ofschoon Inada, Ito en medewerkers reeds in 1915, kort na hun ontdekking van de spir. ictero-haemorrhagiae als verwekker van Weil's ziekte, het gelukt is het microörganisme in de nieren van Japansche veldmuizen (*Microtus montebelli*) aan te toonen.

In Malakka is het Fletcher, die in 1927 een studie heeft gemaakt met leptospiren stammen, geïsoleerd uit de nieren van ratten, gevangen buiten de stad (*Rat rattus diardii jentink?*).

Voor zoover wij het kunnen nagaan zijn er hier te lande daaromtrent geen gegevens te vinden. De gegevens van bijgaande lijst van plaatsnamen en onderzoekers hebben wij verzameld uit het G.T.v.N.I. en uit enkele jaarverslagen van het Afd. Laboratorium Semarang, Makassar.

De onderzoekingen verricht te Weltevreden door Hoesen in 1919 en door Flu in 1920 hebben slechts betrekking op mus decumanus. Kouwenaar kon in 1924 op Sumatra's Oostkust bij 2 mus Rattus griseiventer leptospiren aantoonen van 30 door hem onderzochten wilde ratten. De gevonden micro-organismen konden echter niet worden voortgekweekt. Sardjito en Postmus hebben in 1926 behalve mus decumanus ook enkele (17) huisratten onderzocht. Fischer vond in 1929 te Pangkal Pinang 20 % besmetting bij mus decumanus en 6½ % bij mus rattus.

Rattenonderzoek op Java en Buitengewesten.

Naam van de onderzoekers	Plaats van onderzoek	Jaar	Aantal M. decumanus	Onderzoek R. rat. diardii	Ratten R. rat. brevicaudatus	Aantal positief	Methode van onderzoek
Hoesen	Weltevreden	1919				1	D + P
Flu	id.	1920	35			2	D
Kouwenaar . .	Sum. Oostkust	1924		30 ?		2	P
Sardjito & Postmus .	Weltevreden	1926	23	17		17% 0%	C + D + 0
Fischer	Pangkal Pinang	1929	111	89		20% 6%	0
Sardjito	Makassar	1930	350 216 v 134 j	4		7% 12% 0% 0%	C
J. A. Slot	Belinjoe	1930	108 ?			0%	0
Boelens	Semarang	1931				30%	C
Kirschner . . .	Bandoeng	1931		260		½%	D + C
Slot & v.d. Walle	Bangkinang	1932		?		0%	
Mochtar	Semarang	1933	20			40%	C
Sardjito, Mochtar & Wirasma	Ambarawa .	1936		9	104 12 v 42 j	21% 50% 9% 0%	C

U = Urine onderzoek (donker veld). D = Dierproef. C = Cultuurproef
 uit niersap. 0 = onderzoek nierweefsel (donker veld). P = Pathologisch
 anatomisch nieronderzoek. V = Volwassen exemplaren. J = Jonge exempl.

In het jaarverslag van het afdeellingslaboratorium van Semarang over 1931, deelde Boelens mede, een vondst van 30 % leptospirendragers onder de door hem onderzochte mus decu-

manus, door stukjes nier in Noguchi voedingsbodem te enten. Te Bandoeng kon Kirschner (1932) uit 260 huisratten, vier stammen isoleeren. Het is jammer, dat de wijze, waarop de ratten onderzocht werden, geen berekening van de infectie-index toelaat, hetgeen door Kirschner zelf werd toegegeven.

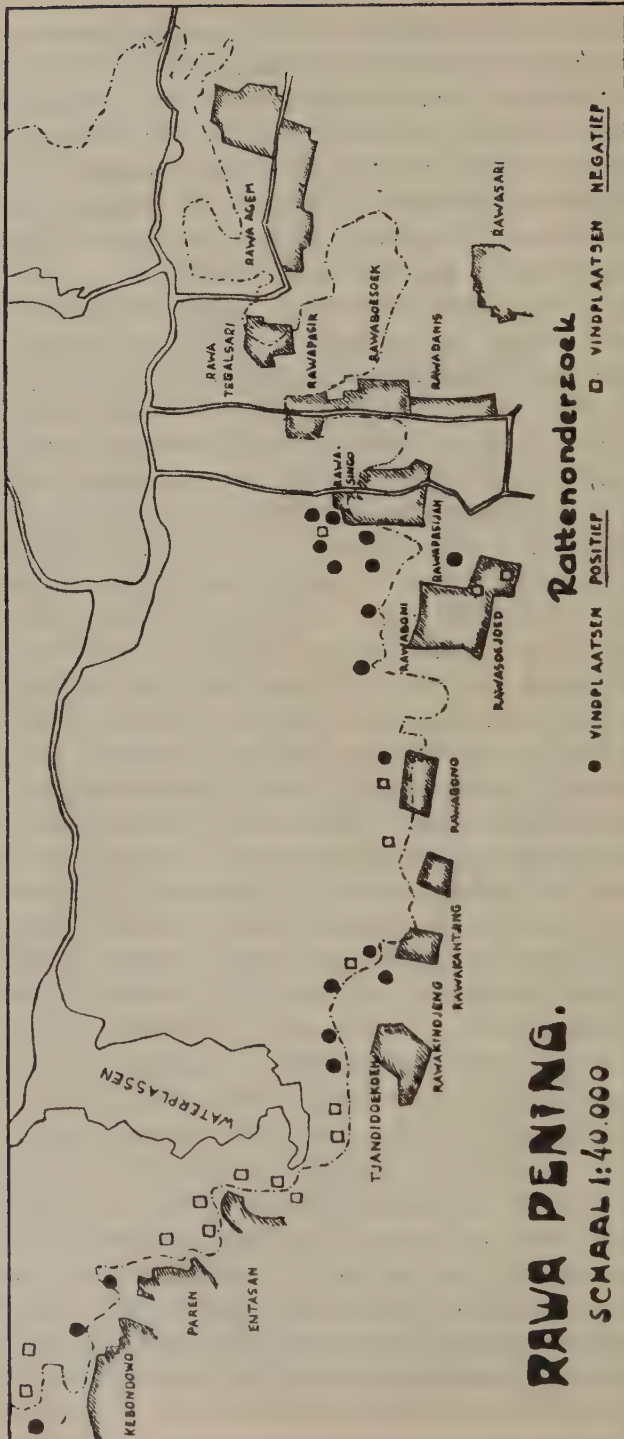
In 1933 heeft een onzer te Semarang melding gemaakt van de resultaten van het onderzoek van leptospiren in de nieren van 20 rioolratten; daarvan zijn 8 positief.

Het is zeker aanbevelenswaard het onderzoek naar leptospirendragers onder de rattenbevolking uit te breiden met het onderzoek van veldratten en in dit speciale geval zijn wij min of meer aangewezen op het onderzoek dezer dieren, omdat, zooals wij reeds boven hebben vermeld, na het uitzetten van een aantal vallen, hoofdzakelijk veldratten werden gevangen.

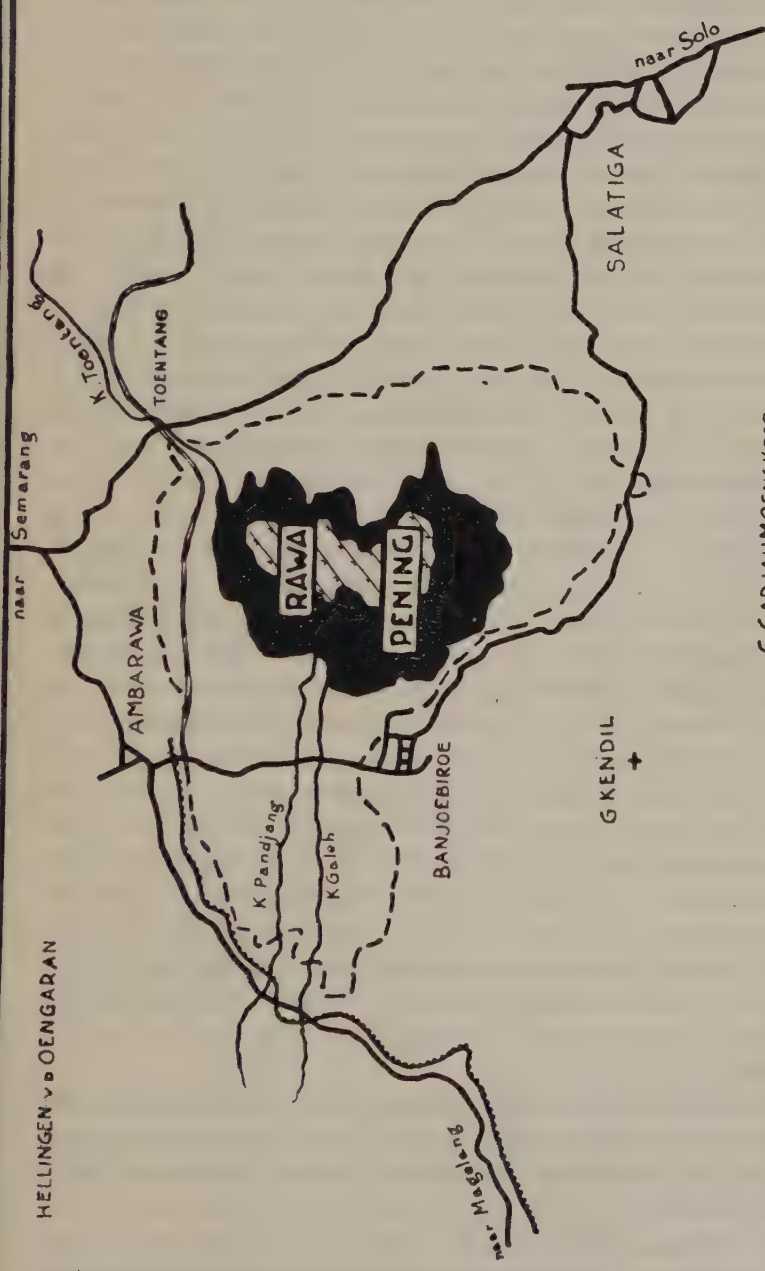
De door ons gevolgde werkmethode om de leptospiren aan te toonen en te kweken bestaat namelijk uit het direct enten van het rattenniersapweefsel op Noguchi voedingsbodem, welke methode reeds eerder door Sardjito en Postmus (1927) werd toegepast. Deze onderzoekers gaven de voorkeur aan de voedingsbodem van Noguchi boven dien van Vervoort, omdat volgens hun bevindingen de groei der leptospiren in Noguchi voedingsbodem geconcentreerd is aan de oppervlakte, waardoor het vinden der leptospiren veel wordt vergemakkelijkt.

Het spreekt welhaast vanzelf, dat het aanbeveling verdient zooveel mogelijk alle andere methoden, z.a. het microscopisch onderzoek der urine, nieren en dierproeven, bij de proeven toe te passen, hetgeen Proehoeman reeds in 1930 heeft gememo-reerd. Hij heeft, door gebruik te maken van de combinatie van alle bekende methoden, een zeer hoog percentage van leptospirendragers onder de volwassen rioolratten kunnen vastleggen. Van de 33 te Amsterdam gevangen volwassen mus decumanus vond hij 73 % „leptospirendragers”.

In de praktijk is het evenwel niet altijd mogelijk de bovengenoemde werkwijze te volgen. Hier hebben wij rekening te houden met den voor ons beschikbaren tijd, hulpkrachten en in deze crisisjaren ook nog met den aankoop van de benodigde proefdieren. Voor degene, die in dezelfde omstandigheden als wij verkeerden, is het zeker van groot belang, dat men een methode kan toepassen met minder moeilijkheden en zonder te veel afbreuk te doen aan de resultaten van het onderzoek. Het



GEWESSE SEMARANG 1925



HELLINGEN v. OENGARAN

Overzichtskaart RAWA PENING.



Drijvende sawah's

1.100 000

GKENDIL +

G.GADJAHMOENGKOFER +

G.TELOMOJO +

microscopisch onderzoek der urine van de ratten kunnen wij b.v. al vast uitschakelen, niet alleen door de omslachtige en tijdroovende wijze, doch ook door het feit, dat de methode ons in den steek laat, wanneer wij met doode ratten materiaal te maken hebben. De door Zuelzer zoo warm aanbevolen werkwijze om de *alkalische rattenurine* te onderzoeken, kunnen wij bij onze proeven eveneens niet aanvaarden, aangezien onze doelstelling niet uitsluitend is het percentage „dragers” op te sporen, doch ook om de aangetoonde leptospiren te kunnen isoleeren en te kweken, teneinde daarna de immunologische verhoudingen der gevonden stammen onderling te kunnen bepalen. Bovendien zijn er ook nog andere redenen, waarom wij ons niet kunnen verlaten op het onderzoek van rattenurine. Volgens Zuelzer is het aantoonen van de leptospiren in versche, alkalische urine der ratten veel sneller, zekerder en veel eenvoudiger dan het onderzoek van versche niersuspensie. Daarentegen heeft de onderzoekster zelf toegegeven, dat in de vrije natuur de ratten hoofdzakelijk zure urine produceeren. M. a. w. in de practijk zou men dus de tientallen te onderzoeken ratten eerst moeten voeren met vegetarische voeding en daarna pas de urine onderzoeken. Een ieder zal het met ons eens zijn, dat deze werkwijze te veel practische bezwaren met zich brengt. Het is ons hier b.v. zelden gelukt, ratten in gevangenschap langer dan een week in leven te houden. Men denke verder aan de practische moeilijkheden om de ratten één voor één te isoleeren, ten einde zeker te zijn van de afkomst van de uitgescheiden urine, etc. Om de eventueel gevonden leptospiren te kunnen kweken is men toch nog genoodzaakt de ratten te dooden en uit het nierweefsel de microorganismen in kunstmatige voedingsmedia te enten. Want steriel opvangen van de rattenurine is een practische onmogelijkheid. Een cavia te enten met de leptospiren houdende rattenurine geeft ons evenmin zekerheid, aangezien bij avirulente stammen de mogelijkheid bestaat, dat de proeven zullen mislukken.

Ten slotte heeft Walch reeds gewezen op het feit, dat de leptospiren in het nierweefsel niet altijd diffuus zijn verspreid, zoodat het microscopisch onderzoek van het nierweefsel eveneens kan falen.

Ook entingen met ratten nierweefsel op caviae meenen wij bij ons onderzoek achterwege te kunnen laten, naar aanleiding

van onze ervaring, dat de uitkomsten ervan niet beter zijn dan bij de andere methode en dat de dierproeven te veel afhankelijk zijn van het al of niet virulent zijn van de leptospiren.

Zooals boven reeds is vermeld, hebben wij doelbewust de methode van enting van niersap in kunstmatige voedingsmedia toegepast en wel in verband met de ervaring van één onzer, opgedaan bij de pogingen om leptospiren stammen te isoleeren door nierweefsel direct te enten op Noguchi voedingsbodem. Naar onze meening geeft deze methode van werken de minste complicaties, behalve dan, wanneer bij de entingen van nierweefsel, het onbesmette gedeelte van de nier wordt genomen. Om deze kans zoo veel mogelijk te reduceeren, worden bij ons onderzoek op meerdere plekken van de nier door middel van een Pasteur pipet (waarvan de punt niet te dun mag zijn) het nierweefsel geprikt en opgezogen. Natuurlijk is voor het uitvoeren van deze methode steriel werken strikt noodzakelijk. Een minimale verontreiniging van de cultuurbuizen is reeds voldoende om de ontwikkeling en de groei der leptospiren te doen mislukken. Phenolrood-oplossing werd als indicator niet gebruikt.

Van deze gelegenheid hebben wij verder gebruik gemaakt de bruikbaarheid van Vervoort's voedingsbodem te vergelijken met die van Noguchi, welke vergelijkende proefneming reeds eerder is verricht door Sardjito en Postmus. Deze onderzoekers hebben de voordeelen van het gebruik van Noguchi voedingsbodem aangetoond, doch hun materiaal was te gering om een definitieve uitspraak hierover te kunnen geven. Het is o.i. dan ook wel gerechtvaardigd, deze methode nogmaals te herhalen met een uitgebreider materiaal.

Na de opening van de buikholte van de te onderzoeken ratten wordt een gedeelte der nieroppervlakte met een gloeiend koperen plaatje afgeschroeid: hierop wordt op verschillende plaatsen een Pasteur pipet in het orgaan gestoken, zoodat er kleine nierweefsel stukjes door capillaire werking kunnen worden opgezogen, die verder in de buizen met Noguchi en Vervoort voedingsbodem worden geënt. Men moet er voor zorgen, dat een voldoende hoeveelheid nierweefsel wordt genomen. Van elke nier worden twee buizen geënt, één met Noguchi en één met Vervoort voedingsmedia. Vervolgens worden de buizen bij kamertemperatuur bewaard en slechts twee keeren onderzocht

op de aanwezigheid van leptospiren en wel den eersten keer 14 dagen en den tweeden keer een maand na de enting.

Het is bekend dat de leptospiren 4 of 5 dagen na de enting microscopisch aan te toonen zijn. Sardjito en Postmus hebben zelfs bij het onderzoek van een rat uit het Militair Hospitaal te Weltevreden de microörganismen in de cultuurbuizen aangetoond 24 uren na de enting. Doch om tijd te besparen en een systematische werkwijze te volgen, is bovengemelde methode voldoende geacht.

Wanneer de cultuurbuizen na het eerste onderzoek negatief zijn uitgevallen, dan worden ze bewaard tot een volgend onderzoek. Het is ons daarbij gebleken, dat er nog enkele stammen zijn, die door hun langzame groei bij het eerste onderzoek microscopisch niet zijn waargenomen. Uit tabel I blijkt dat de stammen R.A. 59, 74, 109, 123, 156 en 166 pas aangetoond zijn na het tweede onderzoek der buizen, dus een maand na de enting van de rattennier. Dat een herhaald onderzoek der buizen noodzakelijk is, behoeft dus niet verder te worden betoogd.

Bij nadere bestudeering van de tabel is tevens gebleken, dat er meer Noguchi voedingsbodembuizen positief zijn uitgevallen in vergelijking met die van Vervoort. De groei der leptospiren in Noguchi voedingsbodem is over het algemeen veel weliger en sneller dan in dien van Vervoort, wat in de tabel is af te leiden uit het grootere aantal plus teekens. Daarmede hebben wij dus de bevinding van Sardjito en Postmus geheel kunnen bevestigen, die de voedingsbodem van Noguchi verkiezen boven dien van Vervoort.

Ten slotte is bij dit onderzoek ook aangetoond, dat men voor het cultiveeren van leptospiren uit de rattennier beslist het materiaal uit beide nieren moet nemen om de kans van slagen zoo groot mogelijk te maken. Bij R.A. 103, 109, 130, 148 en 150 is de rechter nier positief en bij R.A. 92, 104, 156 en 166 alleen de linker nier positief op leptospiren. De overige 14 leptospiren stammen zijn geïsoleerd, zoowel uit de rechter als uit de linker nier.

In het tijdsverloop van 17 September t.m. 22 November 1936, zijn wij in de gelegenheid geweest 104 veldratten en 9 huisratten te onderzoeken. Het uitzetten van vallen in de huizen werd slechts een paar keeren gedaan, aangezien wij voor ons

TABEL I

Rat stam No.	1e onderzoek na 14 dagen.				2e onderzoek na 1 maand			
	R. Nier		L. nier		R. nier		L. nier	
	Noguchi vd. bd.	Vervcoort vd. bd.	N.	V.	N.	N.	N.	V.
R.A. 59 . . .	—	—	—	—	++	—	++	+
R.A. 74 . . .	—	—	—	—	++	—	+	—
R.A. 80 . . .	++++	+++	++	++	+++	++	+++	++
R.A. 81 . . .	+++	++	++	—	+++	+++	+++	—
R.A. 84 . . .	+	—	++++	—	++++	+++	+++	—
R.A. 89 . . .	—	—	+	—	+++	—	+++	—
R.A. 92 . . .	—	—	++++	—	—	—	++++	—
R.A. 94 . . .	+++	—	+++	—	+++	—	+++	—
R.A. 98 . . .	+++	—	—	+	++++	+++	+++	++
R.A. 100 . . .	+++	++	+++	++	++++	+++	++++	++
R.A. 103 . . .	+!	—	—	—	+++	—	—	—
R.A. 104 . . .	—	—	+	—	—	—	++	—
R.A. 106 . . .	+	—	+++	++	++	—	+++	++
R.A. 109 . . .	—	—	—	—	+	—	—	—
R.A. 120 . . .	+	—	+	—	+++	—	+++	—
R.A. 123 . . .	—	—	—	—	—	+!	++	—
R.A. 130 . . .	++	+	—	—	+++	++	—	—
R.A. 135 . . .	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+
R.A. 148 . . .	+	—	—	—	++!	++!	—	—
R.A. 150 . . .	+!	—	—	—	+++	+!	—	—
R.A. 169 . . .	+	—	+	—	++++	+	—	—
R.A. 156 . . .	—	—	—	—	—	—	+!	—
R.A. 166 . . .	—	—	—	—	—	—	+++	—

doel de vangst van huisratten niet noodzakelijk hebben geacht. Het verkrijgen van ratten, die buiten op de sawah leven, was voor ons onderzoek echter wel van belang. Wanneer er bv. onder de op de sawah levende rattenbevolking een groot percentage „dragers” van virulente leptospiren aanwezig is, dan is het denkbaar, dat de „leptospirendragers” de aanwezige waterplas- sen besmetten met hun leptospirenhoudende urine, welke weer tot gevolg kan geven, dat het water van Rawa Pening secundair wordt besmet via de sawah's, die altijd in open verbinding staan met het moeras. Het alkalische moeraswater en haar lage NaCl gehalte bieden verder voor de leptospiren een gunstig milieu om er langer in te blijven leven en eventueel zich te vermenig- vuldigen, hetgeen ook gebleken is uit onze proeven.

In tabel II zijn de dessa's aangegeven, waar de ratten van afkomstig zijn. De vallen werden uitgezet op verschillende plaatsen op de sawah ver buiten de dessa's. Van de 10 onderzochte dorpen zijn er slechts drie, waar geen leptospirendragers zijn geconstateerd. Dit kan worden verklaard, doordat er ter plaatse slechts jonge ratten werden gevangen.

Van de totaal 104 gevangen veldratten zijn er 54 waarbij

TABEL II
Rattenonderzoek op leptospiren. (Om de Rawa-Pening).

Plaats waar de ratten gevangen zijn	Totaal onderzochte veldratten	Hiervan positief	Volwassen ratten 17 cM.		Hiervan positief		Jonge ratten 17 cM.		Hiervan positief	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Tjandidoekoeh . .	19	4	9	3	6	0	20	22	2	2
Rawakindjeng . .	5	1								
Paren	6	2								
Rawagaila	2	—								
Rawakantjing . .	4	—								
Entasan	8	—								
Kebondowo . . .	10	3								
Totaal	54	10	12		6		42		4	
Rawapasioe . . .	36	7								
Rawasoejoet . . .	4	1								
Rawaboni	7	3								
Rawagana	3	2								
	104	23								

nauwkeurige metingen zijn verricht; hiervan zijn 29 mannetjes en 25 wijfjes; 12 volwassen en 42 jonge ratten. Vermoedelijk zijn de jonge ratten door hun jeugdigen leeftijd gemakkelijker te lokken dan de volwassen dieren. Daar de afstand van het laboratorium naar Rawa-Pening nogal behoorlijk is (± 50 KM), werden de ratten zooveel mogelijk levend gevangen. Dood rattenmateriaal kwam meestal in rottende staat bij ons aan en was niet meer bruikbaar voor entingsproeven op cultuurbuizen. De voornaamste kenmerken, die wij regelmatig bij de volwassen wijfjes hebben gevonden zijn: tepelformule 3/3, afmeting van de staart kleiner dan de kop en het lichaam tezamen, grijswitte buikharen en pes planus.

Schüffner en Kuenen achtten het gewenscht bij de gevangen ratten op hun lichaamslengte te letten en hebben daarbij een lengte van 20 cM vastgesteld voor de beoordeeling van het al of niet volwassen zijn der dieren. Als criterium voor volwassen veldratten hebben wij gesteld de lengte van meer dan 17 cM, aangezien de gemiddelde lengte (kop + lichaam) van een veldrat kleiner is dan die van de mus decumanus. We hebben n.l. geconstateerd, dat bij een lengte van 17 cM de veldratten reeds duidelijk ontwikkelde tepels van de mammae vertoonen.

Het aantal „leptospirendragers” onder de 12 volwassen veldratten bedraagt 6, dus een percentage van 50; het onderzoek van 42 jonge veldratten geeft als resultaat 4 dragers. Dit lage percentage is eveneens bekend bij 't onderzoek van jonge rioolratten.

Op de totaal 104 gevangen veldratten in de omgeving van de verschillende dessa's zijn 23 „leptospirendragers” gevonden.

Behalve de bovengenoemde 104 veldratten zijn nog 9 huisratten door ons onderzocht, afkomstig van één der dessa's, met negatief resultaat.

Wanneer wij op bijgaande kaart de positieve vindplaatsen nagaan, dan blijkt tevens, dat de leptospiren herbergende veldratten min of meer diffuus verspreid zijn over het geheele terrein, onmiddellijk gelegen aan den Zuidelijken sector van de Rawa-Pening. De kans voor besmetting van het rawa-water met de door de veldratten uitgescheiden leptospirenhoudende urine bestaat dus wel degelijk.

De vraag is verder gewettigd, of de door de ratten in het sawahwater gedeponeerde urine *virulente leptospiren* bevat, ja dan neen. In het bevestigend geval is de mogelijkheid wel aan te nemen, dat ook het water van de Rawa-Pening besmet zou kunnen worden met de virulente microörganismen.

Het is algemeen bekend dat de door vele onderzoekers gevonden rattenstammen zeer virulent kunnen zijn voor proefdieren.

Schüffner en Kuenen vonden in 1923 bij een rattenonderzoek steeds voor proefdieren virulente leptospiren.

Bij het onderzoek van leptospirendragers onder de rattenbevolking te Denemarken vond Zuelzer in 1934 hoofdzakelijk virulente leptospiren stammen.

Daarentegen zijn er ook gevallen bekend, waarbij de ge-

vonden rattenleptospiren avirulent zijn voor caviae. In Bangkok vond Mendelson (1923) onder 1483 onderzochte ratten 8 positief met leptospiren, die bleken niet pathogeen te zijn voor proefdieren.

De door Kouwenaar in 1924 aangetoonde leptospiren in de nieren van twee huisratten waren eveneens apathogeen voor caviae. Ook Sardjito en Postmus hebben leptospirendragers gevonden, die voortdurend avirulente, voor caviae niet pathogene leptospiren uitscheidde.

De virulentie bepaling der door ons geïsoleerde rattenstammen achten wij om boven aangehaalde redenen zeker noodzakelijk niettegenstaande de wetenschap, dat het voorkomen van Weil's ziekte in een bepaalde streek niet parallel behoeft te gaan met de frequentie van virulente leptospiren herbergende ratten.

Voor dit doel hebben wij alle 23 geïsoleerde leptospirenstammen geënt op jonge caviae met een lichaamsgewicht varieerende van 150 tot 300 gram. Elk dier werd intraperitoneaal ingespoten met 2 cm³ zeer dichte jonge culturen. Gedurende twee weken werden het gewicht en de temperatuur van de proefdieren gecontrôleerd, het buikpunctaat en oorbloed dagelijks microscopisch onderzocht. In verband met de bevindingen van Dinger over het voorkomen van leptospiren in de urine der geënte caviae, waarbij de leptospiren zelfs na 110 dagen konden worden aangetoond, werd de urine bij onze proefdieren regelmatig onderzocht op de aanwezigheid van leptospiren en tevens de reactie der urine bepaald. De dieren, die de besmetting hebben doorstaan en in leven zijn gebleven werden nog drie maanden daarna apart gehouden in daarvoor ingerichte kooien. Dit achtten wij noodig om lichte infecties niet over het hoofd te zien en om eventueel contact infectie te voorkomen.

Wanneer wij de resultaten van dit onderzoek nader bekijken dan kunnen wij de geënte caviae naar de klinische verschijnselen indeelen in vier groepen:

1e groep dieren, die absoluut geen reactie vertoonen en waarbij ook geen leptospiren zijn aan te toonen (stomme infectie?). Tot deze groep behooren de caviae No. 140, 141, 142, 130, 143, 154 en 137, die resp. geënt zijn met de stammen R. A. 59, 74, 84, 89, 92, 103 en 106.

2e groep. Hierbij is een lichte reactie bij de dieren geconstateerd m.n. gewichtverlies en lichte temperatuursverhooging, maar leptospiren werden niet gevonden. Hiertoe behooren de caviae No. 152, 148 en 166 die resp. besmet zijn met de stammen R.A. 123, 130 en 156.

3e groep. De dieren, die tot de derde groep behooren, vertoonen regelmatig gewichtsverlies, temperatuursverhooging en leptospiren in het peritoneaal vocht. Deze lichte infecties hebben de caviae doorstaan, zij genezen daarna volkomen. Tot deze groep zijn gerekend de caviae No. 127, 125, 144, 145, 136, 134, 147, 146, 149, 151, 161 en 174, die resp. ingespoten zijn met de stammen R.A. 80, 81, 94, 98, 100, 104 109, 120, 135, 150, 166 en 169.

4e groep. De cavia No. 150 intraperitoneaal ingespoten met den stam R.A. 148 is de eenigste, die door de virulentie der leptospiren de infectie niet heeft kunnen doorstaan. Het dier vertoonde klinisch de typische Weilverschijnselen en stierf 12 dagen na de enting.

Over het algemeen genomen, kunnen wij dus zeggen, dat een groot deel der geïsoleerde rattenstammen niet bijzonder virulent is voor caviae. Bij caviae No. 134 en 161, ingespoten met stam R.A. 104 en 169, hebben wij de leptospiren in het oorbloed kunnen aantoonen (leptospiraemie), waaruit blijkt, dat deze niet behoeft te leiden tot den dood der caviae, een verschijnsel, dat een onzer reeds in 1927 heeft geconstateerd.

Zelfs wanneer de typische Weilverschijnselen bij het proefdier optreden, z.a. gewichtsverlies, koorts, icterus en leptospiren in het peritoneaal vocht en bloed, dan kan men te voren nog niet met zekerheid zeggen, dat het proefdier aan de gevolgen van de infectie zal bezwijken.

De genezen dieren bleven gedurende drie maanden onder observatie, de urine werd regelmatig onderzocht, doch steeds met negatief resultaat. Slechts bij cavia No. 150 zijn op den 11den ziektedag leptospiren aangetoond. Waarschijnlijk is dit te verklaren, doordat het grootste deel onzer leptospiren-stammen niet bijzonder virulent is en doordat de meeste dieren zure urine produceeren.

Resumeerende kunnen wij vaststellen, dat het onderzoek van de rattenbevolking ten Zuiden van de Rawa-Pening ons

TABEL III.

Cavia No.	Intraperit. ingesp. met 2 cc cultuur	Gewichts- verlies ged.	Temper- stijging ged.	Buikpunctaat positief gedurende	Oorbloed	Icterus	Urine		Dood na	Sectie bevinding
							Reactie	Leptosp.		
140	R.A. 59	—	—	—	—	—	Z	—		
141	R.A. 74	—	—	—	—	—	Z	—		
142	R.A. 84	—	—	—	—	—	A	—		
130	R.A. 89	—	—	—	—	—	A	—		
143	R.A. 92	—	—	—	—	—	Z	—		
154	R.A. 103	—	—	—	—	—	A	—		
137	R.A. 106	—	—	—	—	—	A	—		
152	R.A. 123	5 dg	1 "	—	—	—	Z	—		
148	R.A. 130	6 "	1 "	—	—	—	A	—		
166	R.A. 156	6 "	1 "	—	—	—	A	—		
127	R.A. 80	4 dg.	3 dg.	+3 dg.	—	—	A	—		
125	R.A. 81	5 "	1 "	+4 "	—	—	A	—		
144	R.A. 94	6 "	—	+1 "	—	—	Z	—		
145	R.A. 98	6 "	1 dg.	+3 "	—	—	Z	—		
136	R.A. 100	2 "	1 "	+2 "	—	—		—		
134	R.A. 104	5 "	1 "	+1 "	+	—	Z	—		
147	R.A. 109	7 "	1 "	+4 "	—	—	Z	—		
146	R.A. 120	9 "	—	+1 "	—	—	N	—		
149	R.A. 135	10 "	—	+5 "	—	—	A	—		
151	R.A. 150	5 "	1 dg.	+2 "	—	—	Z	—		
161	R.A. 169	4 "	—	+3 "	+	—	Z	—		
174	R.A. 166	1 "	1 dg.	+3 "	—	—	Z	—		
150	R.A. 148	11 dg.	4 dg.	+5 dg.	+	+	Z	+	12 dg.	Conj. long- bloedingen Lever + Nier +

geleerd heeft, dat de veldratten (*Rattus rattus brevicaudatus*) even goed „dragers” kunnen zijn van leptospiren, zoodat men hier in de tropen bij de bestudeering van de epidemiologie der leptospirosis ook rekening moet houden met het al of niet voorkomen van veldratten in de te onderzoeken waterrijke streken.

Gezien het hooge percentage „dragers” onder de veldratten, die in contact zijn met waterplassen, kan men deze soort ratten beschouwen als de concurrent van de mus *decumanus*, die over de geheele wereld algemeen bekend staat als „virusdragers” van de ziekte van Weil.

Het feit, dat het grootste deel der door ons geïsoleerde

leptospirenstammen, afkomstig van de nieren der veldratten, niet of weinig pathogeen is voor caviae, verklaart ons nog niet, waarom hier op Java de ziekte slechts sporadisch voorkomt. Algemeen bekend is het immers, dat het voorkomen der ziekte van Weil niet parallel behoeft te gaan met het percentage „dragers” van virulente leptospiren. Door het resultaat van dit onderzoek kan men zich wel een voorstelling maken, waarom er in de binnenlanden Weilgevallen zijn geconstateerd, terwijl de mus decumanus ter plaatse onbekend is.

Een nader onderzoek van de door ons geïsoleerde rattenstammen is zeker van belang om te weten, of de bij de veldratten voorkomende leptospirenstammen variaties vertoonen in hun serologische- en immunologische eigenschappen.

Als resultaat van ons onderzoek kunnen wij verder aantekenen, dat wij de bevindingen van Sardjito en Postmus geheel kunnen bevestigen n.l. wat betreft het enten van niersap op Noguchi voedingsbodem. Daarbij is een werkwijze ingevoerd, die als routine werk zeker voldoende betrouwbaar genoemd kan worden. Vooral voor collegae, die ergens in de peripherie zitten en die geen laboratorium tot hun beschikking hebben, is deze werkmethode zeer aan te bevelen. Voor hen kan het dus geen bezwaren meer geven om de leptospiren-index onder de rattenbevolking in hun omgeving te bepalen. De vereischte voedingsmedia, die te verkrijgen zijn bij een der laboratoria, kunnen eenvoudig bij kamertemperatuur worden bewaard.

Wij kunnen uit het leptospira-onderzoek het volgende afleiden:

1. Het enten van rattennierweefsel op Noguchi-voedingsbodem geeft betere resultaten dan dat op Vervoort-voedingsmedium.
2. Bij het onderzoek van 104 veldratten zijn 23 leptospirenstammen geïsoleerd en gecultiveerd.
3. 50 % der volwassen veldratten bleken geïnfecteerd te zijn met de leptospirae; bij de jonge exemplaren zijn 9 % „dragers” gevonden.
4. Slechts een van de 23 leptospirenstammen is virulent voor caviae, de overige stammen zijn veel minder pathogeen voor caviae.
5. Op de sawah ten Zuiden van de Rawa-Pening leven veldratten, die blijken geïnfecteerd te zijn met avirulente en virulente leptospiren.

6. De mogelijkheid is niet uitgesloten, dat het water van de Rawa-Pening voortdurend besmet wordt met voor caviae virulente leptospiren.

Nu dient de volgende vraag nog nader onder het oog te worden gezien.

Zal de kans op infectie met typhus-dysenterie bacillen, afkomstig van de urine en ontlasting van zieken en bacillendragers (mensen) in de dessa's, gelijk te stellen zijn met de infectiekans veroorzaakt door leptospiren, die met de urine door leptospirendragers (ratten) worden uitgescheiden?

Uit het *b. coli*-onderzoek is boven reeds vermeld, dat in het midden van de plassen, ver verwijderd van de kanten, de kans op aanwezigheid van typhus-dysenterie bacteriën heel gering is. Zou men dan niet hetzelfde kunnen zeggen ten opzichte van de aanwezigheid van leptospiren?

Bij het beantwoorden van deze vraag, dienen de biologische eigenschappen van beide microörganismen in aanmerking genomen te worden.

De typhus-dysenteriebacillen behooren tot de veel eischende microörganismen; voor hun groei hebben zij vloeistoffen nodig, welke betrekkelijk veel eiwit- of organische stoffen met hoog moleculair gewicht, bevatten.

Deze, voor de typhus- en dysenteriebacillen voedende stoffen, welke in de Rawa-Pening door de stroompjes aangevoerd worden, verdwijnen in de waterplassen langzamerhand, ten gevolge van de inwerking der zelfreinigingsprocessen, waardoor de levensvoorwaarden voor de bovengenoemde bacillen verslechterd worden.

Een factor, die bij de opruiming van pathogene bacteriën een groote rol speelt, is wel de activiteit van de protozoën, die de bacteriën als voedsel opslorpen.

Flu heeft met zijn proeven om het zelfreinigingsproces van het rivierwater Tjiliwoeng na te gaan, kunnen vaststellen, dat opzettelijk groote hoeveelheden aan het water toegevoegde choleravibrionen, dysenterie- en typhus-bacteriën door den invloed dezer processen na een week verdwenen zijn.

Bij de leptospiren schijnt de biologie anders te zijn. Bij de proeven van één onzer (S) is aangetoond, dat in helder door een bacteriën-filter gefiltreerd grachtwater, te midden van

andere verontreinigingsbacteriën, de leptospiren zich kunnen vermenigvuldigen. Eveneens is dit het geval met onze virulente veldrattenstam No. 148 in het gefiltreerde water van Rawa-Pening.

De proeven van Appelman demonstreeren verder, dat in grachtwater de pathogene leptospiren te midden van andere microflora en fauna zich in stand kunnen houden.

De verschillende leptospirosis-epidemieën ten gevolge van baden geciteerd, geven mede een aanwijzing, dat de leptospiren in de natuur zich beter kunnen handhaven dan de typhus-dysenterie bacillen, zoodat wij hier ten opzichte van de kans van infectie met leptospiren een andere zienswijze moeten huldigen dan die met de typhus-dysenterie groep.

Conclusie.

Uit de boven medegedeelde onderzoeken is af te leiden, dat verwacht kan worden, dat de infectiekans met bacteriën van de typhus- en dysenterie groep, ten gevolge van het baden in het midden van de Rawa-Pening ver van de kanten, gering is en dat deze nog verminderd kan worden als de baders geregeld met prophylactisch typhus- en dysenterievaccin ingeënt zijn; de infectiekans is binnen een strook van ± 200 M langs de kanten grooter dan in het midden.

Verder is, gezien het hooge percentage van leptospirendragers onder de sawah-ratten, een infectie met leptospira bij het baden in de Rawa-Pening te vreezen.

Zij, die slechts roeien en zeilen in de waterplassen, behoeven niet beducht te zijn voor het verkrijgen van bovengenoemde ziekten.

LITERATUUR.

- Appelman* (1934) Diss.
Bessem (1936) G. T. v. N. I. Deel 76 blz. 2667.
Dinger, J. E. (1932) G. T. v. N. I. Deel 72 blz. 1440.
Ful, P. C. (1921) G. T. v. N. I. Deel 61 blz. 231.
 id. (1920) Meded. DVG. Deel 7 blz. 106.
 id. (1921) id. Deel 3 blz. 316.
Fischer, I. A. (1930) G. T. v. N. I. Deel 70 blz. 915.
Hoesen (1920) G. T. v. N. I. Deel 60 blz. 352.
Kirschner, L. (1932) G. T. v. N. I. Deel 72 blz. 658.

- Kolle en Wassermann* (1930) Handbuch der path. Mikroorganismen Lief. 41.
- Kramer, P. H.* (1932) Ned. T. v. G. 76 III blz. 4296.
- Kathe* (1928) Zbl. f. Bakt. Bd. 109 S. 284.
- Kouwenaar, W. G. T. v. N. I.* Deel 65 afl. 2.
- Mochtar, A.* (1927) Diss.
id. G. T. v. N. I. Deel 73 blz. 1182.
- Manson-Bahr* (1922) Lancet Vol. 2 p. 1056.
- Proehoemann, S.* (1930) Dis.
- Railliet* (1925) Zbl. f. d. ges. Hyg. Bd. 10 S. 517.
- Romijn, P.* (1932) Ned. T. v. G. IV. blz. 5832.
- Sardjito, M.* (1932) G. T. v. N. I. Deel 72 Alf. 20.
- Sardjito, M. en Postmus, S.* (1927) G. T. v. N. I. Deel 67 afl. 1
- Sardjito, M. en Zuelzer, M.* (1928) Meded. DVG. Deel 4 blz. 625.
- Slot, J. A.* (1929) G. T. v. N. I. Deel 69 blz. 1211.
- Slot, G. A. en v. d. Walle, N.* (1932) G. T. v. N. I. Deel 72 blz. 1579.
- Schuffner, W.* (1934) Transaction of the Royal Society of Trop. Med. en Hygiene. Vol. 28. No. 1. (1932) Ned. T. v. G. IV. blz. 5548.
- Schuffner, W. en Kuenen* (1923) Ned. T. v. G. II No. 20. blz. 2018.
- Taylor, J. en Goyle, A. N.* (1931) Indian Med. Research Memoirs No. 20.
- Zuelzer, M.* (1936) Zentralbl. für Bakteriologie Bd. 136.
id. (1935) Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. Vol. XII Fasc. 4 blz. 1440.

l'Influence des hormones cristallisées sur la croissance de certaines espèces de levures

PAR

Dr. Ir. A. Ph. WEBER. Dr. ès Sc.

Introduction.

Le présent travail a été consacré à l'étude de l'influence possible sur la croissance d'organismes unicellulaires appartenant au règne végétal, de certaines hormones connues à l'état chimiquement pur.

En examinant les recherches effectuées jusqu'à présent ¹⁾ il nous a semblé qu'on n'était pas encore arrivé à démontrer avec certitude l'intervention des hormones sur le développement des végétaux. Nous avons pensé que ces résultats douteux étaient dus surtout aux grandes difficultés que présentent les expériences portant sur les plantes d'une organisation supérieure.

Pour nos investigations, nous avons fixé en premier lieu notre attention sur le choix d'un organisme végétal, le plus simple possible, afin d'en pouvoir étudier le développement dans des conditions pouvant être déterminées avec le maximum de précision.

A notre avis, la levure convenait le mieux à cette étude. Cet organisme unicellulaire ayant été l'objet de très nombreuses recherches, nous avons à notre disposition des connaissances assez complètes sur les conditions dans lesquelles il se développe. On sait à l'heure actuelle que certaines levures sont capables de se développer dans un milieu purement synthétique. Cette découverte a présenté une grande importance pour notre travail.

¹⁾ voir: Weber, A. Ph. Thèse de doctorat ès sciences physiques. Paris 1936.

Afin de pouvoir faire entrer également dans nos recherches les levures ne produisant pas la fermentation alcoolique, nous avons décidé de les étudier toutes en aérobiose. En effet, les levures possédant le pouvoir fermentatif sont aussi capables de pousser en présence d'air; la fermentation disparaît alors presque entièrement. Un des principaux avantages de la culture aérobie réside dans le fait qu'elle présente une technique expérimentale relativement simple et que l'on peut obtenir un développement important dans un milieu contenant très peu de sucre.

Après avoir comparé les différentes méthodes de détermination de la croissance des levures décrites dans la littérature, nous avons fixé notre choix sur la méthode pondérale, qui présente le maximum de précision. Ayant examiné un certain nombre d'espèces de levures, nous nous sommes enfin décidé pour treize d'entre elles, de nature très différentes et répondant bien aux exigences expérimentales.

C'est sur ces levures que nous avons recherché l'influence de huit hormones obtenues à l'état cristallisé.

De ces expériences nous avons tiré la conclusion que les hormones sexuelles femelles aussi bien que mâles peuvent, administrées en quantités minimales, exercer une action favorable sur la croissance de certaines levures.

Dans d'autres expériences nous avons montré que l'action hormonale est étroitement liée à la présence de traces de certains éléments minéraux dans le milieu nutritif.

1. La solution nutritive.

Pour nos expériences, nous avons fixé notre choix sur le milieu synthétique de Miss Reader ²⁾. Cette solution nutritive, qui contient le glucose en tant que source de carbone et le sulfate d'ammonium en tant que source d'azote, est utilisable d'une façon très générale; en effet, le glucose peut être assimilé par toutes les espèces de levures ³⁾, le sulfate d'ammonium par la majorité.

Tous les éléments constitutifs, sauf PO_4HK^2 , peuvent être purifiés d'une manière relativement simple. Nous avons rem-

²⁾ Reader, V. Biochem. J. **21**, 1927, p. 904.

³⁾ Lodder, J. *Die anaskosporogenen Hefen*, p. 57. Verhand. Akad. Wetenschappen Amsterdam, 2e Section, t. **32**, 1934.

placé ce sel par PO^4HNa^2 , lequel est facilement cristallisable et, pour ne pas changer la composition de la solution nutritive de Reader, nous avons remplacé une certaine quantité de ClNa par une quantité équivalente de ClK .

Selon les observations d'un grand nombre d'auteurs, de petites quantités de certains métaux et métalloïdes sont indispensables à l'accomplissement du processus vital. Généralement, ces catalyseurs minéraux agissent en concentrations infinitésimales ⁴⁾.

Ces données nous ont amené à ajouter des traces de ces substances actives au milieu de Reader. Ce faisant, nous avons pris en considération le fait que, malgré toutes les précautions, il se peut très bien que les sels nutritifs contiennent encore, même après la purification, des traces des matières mentionnées ci-dessus. En outre, il y a lieu de noter que pendant l'expérience une petite quantité de ces éléments peut, par dissolution partielle de la paroi de verre, s'introduire dans le liquide de culture, et sûrement la quantité de ces matières dissoutes n'est pas toujours la même. Si l'on ajoutait d'avance une certaine quantité de ces éléments actifs, une petite augmentation par dissolution du verre n'aurait aucune importance.

En tenant compte de ces considérations, nous avons composé notre milieu de façon qu'il contienne par litre:

Glucose	10 gr.	
$\text{SO}^4(\text{NH}^4)^2$	3 gr.	
$\text{PO}^4\text{H}^2\text{K}$	1 gr.	
PO^4HNa^2	0 gr.	1304
ClNa	0 gr.	3926
ClK	0 gr.	1369
$(\text{NO}^3)^2\text{Ca}$	0 gr.	4000
$\text{SO}^4\text{Mg}, 7\text{H}^2\text{O}$	0 gr.	7000
NO^3Ti	0 gr.	001303 = 1 mgr. de Ti.
SO^4Mn	0 gr.	002748 = 1 mgr. de Mn.
$\text{SO}^4\text{Cu}, 5\text{H}^2\text{O}$	0 gr.	000393 = 0 mgr. 1 de Cu.
$\text{SO}^4\text{Zn}, 7\text{H}^2\text{O}$	0 gr.	004396 = 1 mgr. de Zn.
IK	0 gr.	001308 = 1 mgr. de I
BO^3H^3	0 gr.	005718 = 1 mgr. de B.

La préparation de la solution nutritive a été effectuée avec beaucoup de soin. Les sels et le glucose ont été pesés à l'aide de

⁴⁾ voir: thèse, p. 19.

petites cuillers en verre dans des capsules en Pyrex soigneusement nettoyées, sur une balance sensible. Dans une fiole jaugée, bouchée à l'émeri, nous avons porté successivement environ 500 cm³ d'eau pure, 100 cm³ d'une solution d'éléments nutritifs (sauf (NO³)²Ca), 10 cm³ d'une solution contenant 0 gr. 4 de (NO³)²Ca, 5 cm³ d'une solution des éléments actifs et ensuite la quantité d'eau nécessaire pour faire 1 litre.

Après avoir bien agité la solution obtenue, nous l'avons versée dans un flacon Pyrex de 2 litres stérilisable à l'autoclave. Entre le bouchon et le goulot du flacon, nous avons mis un petit fil de coton blanc, dûment nettoyé au préalable.

La stérilisation de la solution nutritive a été obtenue par un séjour à l'autoclave à 105° pendant une demi-heure.

Le liquide traité de cette façon est resté absolument limpide et incolore. La concentration en ions H (pH), déterminée d'après la méthode de Michaelis en était d'environ 6,5.

2. Purification des composants de la solution nutritive.

Nous avons soumis tous les composants du milieu nutritif à une purification poussée. De plus, la quantité de chaque corps, hormis l'eau, soumise à la purification, a été prise suffisante pour permettre d'effectuer toute la série des expériences avec une même préparation.

Nous avons purifié l'eau (distillée au préalable suivant les méthodes usuelles dans le laboratoire) en la distillant sous pression réduite, après addition d'une petite quantité d'une solution alcaline de permanganate.

Le distillat ainsi obtenu fut ensuite redistillé, sous pression réduite, dans un appareil spécialement conçu par nous et entièrement construit en verre Pyrex. Nous en donnerons ici une brève description :

L'appareil se compose d'un ballon distillatoire de 5 litres relié par une colonne et un réfrigérant en serpentín à un ballon récepteur de 3 litres. La colonne a été construite de façon telle que, en pratique, il soit impossible que des particules liquides soient entraînées par le courant de vapeur. La jonction entre la colonne et le ballon distillatoire est réalisée au moyen d'un rodage plat qui tient le vide sans avoir besoin d'être graissé. Les autres points de jonction sont également rodés à sec.

On remplit l'appareil d'eau par l'orifice A en aspirant l'air

en C. Le ballon récepteur se vide en remplaçant le bouchon B par un tube à angle droit dont l'extrémité inférieure se trouve

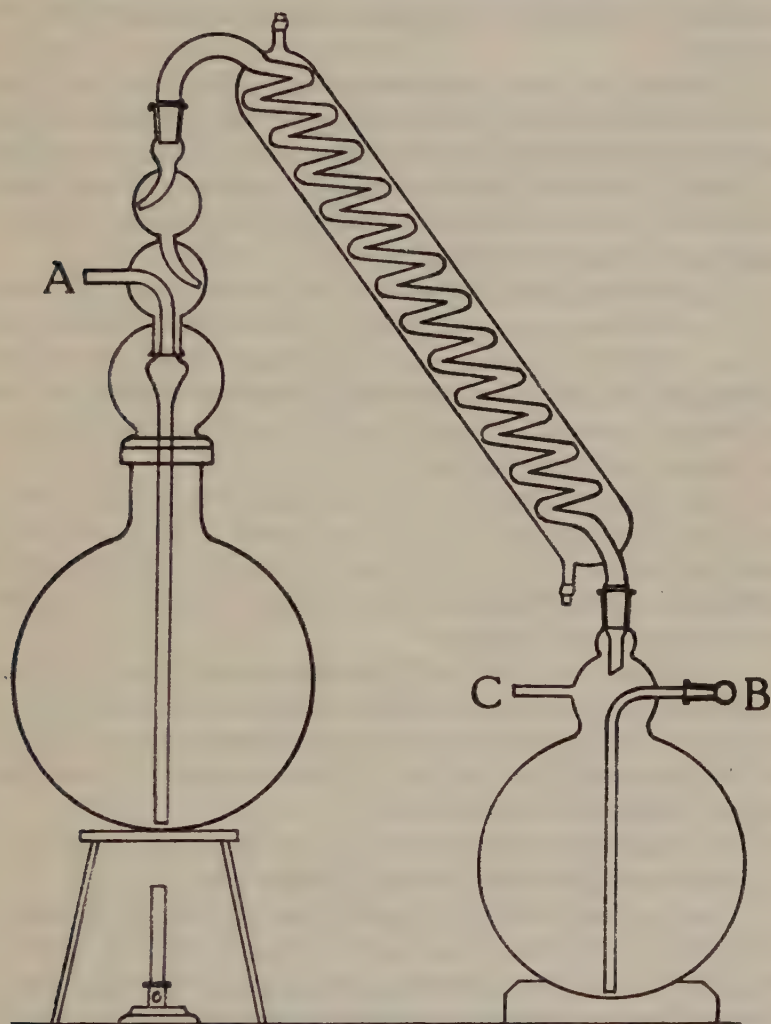


Fig. 1. Appareil à distillation dans le vide.

au-dessous du niveau du fond du ballon. En soufflant légèrement en A, le ballon se vide par siphonnage.

Pendant la marche, l'orifice C se trouve relié par un flacon de sûreté à une trompe. En A l'entrée d'air (filtré à travers un tampon de coton) est réglée de façon telle que le liquide soit soumis à une ébullition tranquille.

En général, la température d'ébullition était de 28° à 30° . A cette température, le verre ne se dissout que très faiblement. La vitesse de distillation de l'eau est à peu près trois quarts de litre par heure.

L'appareil se prête parfaitement à la distillation sous pression normale. Dans ce cas, on peut supprimer les morceaux de pierre ponce d'habitude indispensables à une ébullition régulière en faisant passer un faible courant d'air. Les sels faisant partie de notre solution nutritive, étaient des produits de qualité supérieure de la maison Rhône-Poulenc.

La propreté parfaite de tout le matériel employé au cours de la purification des sels étant de première importance, nous l'avons nettoyé au moyen d'un chauffage dans un mélange chromique, suivi de rinçages et ébullitions répétés dans de l'eau distillée; en dernier lieu, nous avons rincé plusieurs fois dans de l'eau bi-, puis tri-distillée.

Pour la cristallisation, on s'est uniquement servi de l'eau la plus pure (distillée trois fois). Nous avons filtré une solution assez concentrée du sel sur un entonnoir filtrant à plaque en verre fritté d'Iéna N° 3G4, de façon telle que la solution n'entrât en contact qu'avec du verre.

Après quoi, on a cristallisé à plusieurs reprises, en évitant tout contact avec des matières autres que le verre. A part les sels à l'état stable dans les conditions normales, tels que SO^4Mg , $7\text{H}^2\text{O}$, SO^4Cu , $5\text{H}^2\text{O}$ et SO^4Zn , $7\text{H}^2\text{O}$, nous avons préparé tous les autres sels à l'état anhydre.

La conservation des sels a eu lieu dans des flacons bouchés à l'émeri placés dans une armoire à dessécher.

Nous avons purifié le glucose (pur anhydre de la maison Kuhlmann) en filtrant une solution chaude dans de l'alcool à 90 p. 100, sur un filtre en verre fritté, par la méthode ci-dessus décrite. Ensuite, nous avons soumis le glucose à deux cristallisations troublées dans l'alcool à 90 p. 100.

Le point de fusion (vérifié) du produit, très pur, ainsi obtenu, était de 145° — $145^{\circ},5$.

L'alcool qui a servi à la cristallisation du glucose avait été purifié deux fois d'après la méthode de Plücker ⁵⁾.

⁵⁾ Plücker, H. Chem. Zentr. 1909 (No. 1), p. 1973.

3. La détermination de la croissance.

Il fallait, avant tout, connaître une méthode qui nous permit de mesurer avec précision la croissance de la levure. La littérature nous en cite plusieurs.⁶⁾

Notre choix s'est enfin arrêté à la méthode pondérale, préconisée surtout, ces dernières années, par N. Nielsen⁷⁾. Les mesures sont basées ici sur la quantité de matière sèche que l'on obtient après filtration de la suspension de levure, suivi de lavage, desséchement et pesée du résidu.

Après de nombreuses expériences, nous avons trouvé que, en filtrant avec précaution, les creusets filtrants d'Iéna n°IG4 donnaient de bons résultats. Toutes les levures que nous avons étudiées y étaient quantitativement retenues.

Nous avons ensuite cherché à savoir pendant combien de temps il fallait maintenir le filtre contenant la levure dans l'étuve à 105° pour obtenir un poids constant.

Si l'on filtre une suspension contenant 300 mgr. de levure de boulangerie, le poids du résidu, après un séjour de seize heures à l'étuve à 105°, ne diminue plus. En prolongeant le chauffage, le poids augmente légèrement par suite de l'oxydation qui se produit.

Au cours de ces expériences, nous avons remarqué que la couche de levure desséchée qui se trouve sur le filtre se déchirait pendant le refroidissement, ce qui entraînait un arrachement de toute la couche superficielle de la plaque filtrante. Remarquons que le filtre en verre n'est pas ou est faiblement attaqué s'il contient moins de 50 mgr. de levure desséchée.

Nous nous étonnons que Nielsen⁸⁾, qui a travaillé dans les mêmes conditions, ne mentionne aucune atteinte de ces filtres en verre.

Après avoir essayé d'autres méthodes, nous avons enfin déposé sur le fond du creuset une rondelle de papier filtre de première qualité (Berzélius n° 00). Après desséchement à 105° de plus de 100 mgr. de levure, ce papier se déchirait, mais le filtre en verre restait intact.

Nous avons déterminé la croissance en retranchant de la

⁶⁾ voir: thèse, pp. 25 e.s.

⁷⁾ Nielsen, N. Compt. rend. lab. Carlsberg, **19**, 1933, No. 16.

⁸⁾ Nielsen, N. Compt. rend. lab. Carlsberg, **21**, 1935, No. 7.

quantité de substance sèche formée par la levure après un séjour dans notre milieu nutritif à 30° , la quantité de matière sèche qui, sous forme de levure vivante, nous a servi à ensemençer le milieu.

Pour doser cette dernière quantité, nous avons filtré un volume connu de la suspension destinée à l'ensemencement sur un creuset filtrant en verre d'Iéna n° IG4, pesé au préalable.

Quand toute la levure se trouvait sur le filtre, nous l'avons lavée plusieurs fois à l'eau distillée et filtrée. Après dessèchement à 105° , pendant seize heures; on a pesé le résidu au bout d'un séjour de deux heures dans un dessiccateur contenant de l'anhydride phosphorique.

La pesée a été effectuée avec beaucoup de soin⁹⁾. Nous avons porté immédiatement le creuset, retiré du dessiccateur, dans un flacon à tare muni d'un bouchon en verre rodé.

D'une façon générale, nos pesées présentaient une précision à 0 mgr. 1 près.

4. Les hormones.

Au cours de nos recherches, nous avons étudié l'action des principales hormones obtenues à l'état cristallisé, à savoir: la folliculine (oestron), le benzoate de dihydrofolliculine (oestradiol), l'androstérone, la testostérone, la thyroxine, l'adrénaline, l'insuline et l'hormone végétale l'hétéro-auxine.

A l'exception de l'insuline dont on ne connaît pas encore la formule, ces hormones étaient chimiquement pures. La folliculine $C^{18}H^{22}O^2$ (p.d.f. 258° — 261° , $[\alpha]_D^{20} + 164^{\circ}$, 1 gr. = 10.000.000 U.I.) et le benzoate de dihydrofolliculine $C^{25}H^{29}O^3$ (p.d.f. 176° — 180°) provenaient de la maison „Organon” à Oss (Hollande).

La testostérone $C^{19}H^{28}O^2$ avait été mise à notre disposition par la maison Roussel; elle avait été obtenue synthétiquement par la méthode de Girard. L'autre hormone mâle, l'androstérone $C^{19}H^{30}O^2$, était un produit synthétique des usines Rhône-Poulenc.

La thyroxine $C^{15}H^{11}O^4I^4$ provenait de la société Roche.

De l'adrénaline $C^9H^{15}O^3N$ nous avions à notre disposition une préparation très pure, obtenue, dans le temps, par le professeur G. Bertrand. La longue conservation de ce produit avait entraîné, par oxydation, une légère coloration brunâtre.

⁹⁾ voir: thèse, p. 29.

Pour nettoyer cette adrénaline nous avons opéré de la façon suivante. On dissout l'adrénaline dans de l'acide acétique à 10 p. 100 et, après filtration, on ajoute à la solution limpide un peu d'acétate de plomb; ensuite, on envoie dans la solution un courant de H^2S jusqu'à ce que le plomb soit quantitativement précipité. Les produits d'oxydation de l'adrénaline sont entièrement entraînés par les fins flocons du précipité, de sorte qu'après filtration et addition au filtrat de la quantité calculée d'ammoniaque pur à 10 p. 100, nous avons obtenu des cristaux parfaitement incolores. L'adrénaline est alors séparée par filtration du liquide-mère, et, après lavage soigneux à l'eau filtrée et à l'alcool, on la dessèche dans le vide sulfurique.

Nous avons employé dans nos recherches deux préparations différentes d'insuline. L'une, sous forme cristallisée, provenait de la maison Organon (Hollande), l'autre était un produit amorphe de la maison Roussel. D'après les données, 1 mgr. du premier produit correspondait à 24 unités internationales, 1 mgr. du second contenait 22 unités.

La seule hormone végétale que nous avons employée était l'hétéro-auxine $C^{10}H^9O^2N$ que l'on retrouve également dans la levure ¹⁰⁾. Nous devons notre préparation à M. le professeur S. C. J. Olivier, à Wageningen (Hollande), qui a obtenu par synthèse un produit très pur. Le point de fusion en était de $167^{\circ},5-168^{\circ}$.

Toutes les hormones ont été administrées en solution alcoolique, ce qui présente divers avantages.

Premièrement, les hormones sexuelles et l'hétéro-auxine se dissolvent facilement dans ce solvant et ces solutions ont la propriété de pouvoir se conserver pendant un temps assez long sans subir de modification de leur activité ¹¹⁾. Deuxièmement, ces solutions alcooliques sont généralement stériles. En effet, nous n'avons jamais eu d'infection due aux solutions d'hormones.

La pesée des hormones a été effectuée sur une balance sensible. D'une façon générale, nous en avons pesé 25 mgr. 0 dans un petit tube scellé à une extrémité. Ensuite, nous avons porté le petit tube dans un flacon bouché à l'émeri, et nous y avons ajouté 25 cm³ 0 d'alcool pur.

¹⁰⁾ Kögl, F. et Kostermans, D. G. F. R. Z. physiol. Chem. **228**, 1934, p. 113.

¹¹⁾ Rowlands, I. W. et Callow, R. K. Biochem. J. **29**, 1935, p. 837.

Nous avons toujours étudié l'influence des hormones à des concentrations de 50 γ , 10 γ , 1 γ et 0,1 γ pour 0 cm³ 1 d'alcool; elles ont été obtenues par addition d'alcool à la solution précédente. Dans quelques cas, on a également employé des concentrations de 100 γ et 0,01 γ pour 0 cm³ 1.

C'est un fait connu que la thyroxine et l'adrénaline sont très peu solubles dans l'alcool.

Pour la thyroxine, nous avons préparé le sel de potassium en ajoutant à la suspension de 25 mgr. 0 d'hormone dans 25 cm³ 0 d'alcool une quantité suffisante (0 cm³ 075) d'une solution alcoolique de KOH pur pour obtenir la dissolution complète.

Nous avons obtenu la solution d'adrénaline par la même méthode en ajoutant la quantité nécessaire (0 cm³ 05) d'acide chlorhydrique concentré et distillé.

Les deux échantillons d'insuline ont été dissous dans de l'alcool à 60 p. 100. La forme cristallisée se dissolvait difficilement. En étudiant cette hormone, nous avons eu soin d'ajouter à la fiole destinée à l'expérience à blanc 0 cm³ 1 d'alcool à 60 p. 100.

5. *Le choix des levures.*

Il était important dans les conditions de nos expériences de choisir des levures présentant un développement d'une intensité moyenne.

De plus, il fallait que les levures choisies donnent une bonne suspension et puissent être filtrées sans perte sur un creuset d'Iéna IG4.

Après de nombreuses expériences nous avons réuni 13 espèces de levures, qui satisfaisaient aux conditions requises, à savoir:

Torula monosa Kluyver,
 Levure de boulangerie (culture pure),
Hansenula anomala (Hansen) Sydow,
Hansenula saturnus (Klöcker) Sydow,
Mycoderma Bordetii Kufferath,
Torulopsis rotundata Redaelli,
Rhodotorula Suganii Okunuki,
Rhodotorula glutinis var. *Saitoi* (Ciferri et Redaelli) Lodder,
Rhodotorula rubra var. *longa* Lodder,

Rhodotorula sanniei (Ciferri et Redaelli) Lodder,
Rhodotorula bronchialis (Ciferri et Redaelli) Lodder,
Rhodotorula flava (Saito) Lodder,
Rhodotorula longissima Lodder.

Toutes ces espèces étaient des cultures pures qui provenaient du „Centraal Bureau voor Schimmelcultures” à Delft (Hollande). Une seule exception: la culture pure de levure de boulangerie, que nous avons isolée d'un produit du commerce.

Dans notre choix nous avons insisté sur le fait d'avoir, autant que possible, des espèces dissemblables.

Nos levures ont montré de grandes différences au point de vue de leurs propriétés physiologiques, de leur forme, de leur couleur et de leur origine ¹²).

D'après leur mode de croissance on pouvait les classer en deux groupes.

Les levures constituant le premier groupe pouvaient, par repiquage, continuer indéfiniment à pousser dans notre milieu synthétique. C'étaient *Mycoderma Bordetii*, les deux espèces *Hansenula*, *Rhodotorula longissima*, *Rhodotorula bronchialis*, *Rhodotorula Suganii* et *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*. Les levures du deuxième groupe ne présentaient dans notre solution une croissance appréciable que pendant la première journée. Si l'on repiquait un peu de la suspension datant de vingt-quatre heures dans une fiole contenant de la solution nutritive fraîche, ces levures ne présentaient plus aucune croissance.

La croissance ne s'arrêtait donc pas à cause d'une carence en éléments nutritifs du milieu, mais elle semblait plutôt dépendre de certaines substances présentes dans le malt gélosé et que l'on apportait dans le liquide de culture en même temps que les cellulesensemencées.

D'accord avec les opinions généralement admises à ce sujet, nous donnerons à ces éléments indispensables à la croissance de certaines levures en milieu synthétique le nom de „bios”.

D'après cette conception, les levures du premier groupe seraient donc capables de produire du bios.

On a dit que les levures qui pouvaient assimiler l'azote sous forme de nitrate étaient capables de produire le bios dans un

¹² voir: thèse, pp. 37 e.s.

milieu synthétique, alors que celles qui n'assimilaient pas le nitrate avaient besoin de cette substance. Nous opposant à cette opinion nous avons trouvé que *Torulopsis rotundata*, quoique capable d'assimiler du nitrate, présente en milieu synthétique un développement restreint.

Remarquons enfin que nous n'avons pas pu confirmer l'opinion de Richards¹⁸⁾, d'après laquelle le bios de Wildiers pourrait être identifié au thallium; en effet, sur nos treize espèces de levures, six ne pouvaient continuer à pousser en l'absence d'une petite quantité d'extrait de malt, malgré la présence de thallium dans notre milieu de culture.

6. La technique expérimentale.

La culture des levures a été effectuée dans des fioles coniques en verre Pyrex, de 150 cm³, qui ont été nettoyées par la méthode (décrite page 84) employée pour tout le matériel en verre. Ces fioles étaient bouchées par un tampon de coton assez lâche et stérilisées pendant une demi-heure au four électrique à 170°. On versait le liquide de culture, conservé dans un flacon Pyrex de 2 litres, dans un ballon à goulot court, de 250 cm³ ou 500 cm³, et de là on en portait, au moyen d'une pipette stérile en verre Pyrex, 50 cm³ 0 dans chaque fiole.

Puis, nous y avons ajouté une quantité dosée d'hormone, toujours dissoute dans 0 cm³ 1 d'alcool, à l'aide de petites pipettes stériles. La fiole destinée à l'expérience à blanc reçut 0 cm³ 1 du même alcool qui avait servi à la préparation de la solution de l'hormone.

Après avoir agité toutes les fioles, nous les avons ensemencées en y portant, au moyen d'une pipette stérile, 1 cm³ 0 de la suspension de levure. Nous les avons alors immédiatement placées dans un thermostat rempli d'eau dont la température était maintenue rigoureusement à 30°0 C. Pour éviter que les cellules se déposent au fond et pour obtenir en même temps une bonne aération régulière, nous avons pourvu le thermostat d'un système, destiné à agiter de façon continue (120 secousses par minute) une vingtaine de fioles.

Après un développement suffisant de la culture, on a retiré

¹⁸⁾ Richards, O. W. J. Biol. Chem. **96**, 1932, p. 405.

la fiole du thermostat et on l'a laissée refroidir pendant une heure dans la glacière pour arrêter la croissance.

Ensuite, on a filtré la suspension d'après la méthode décrite ci-dessus, et on a pesé le résidu sec.

Dans la plupart de nos expériences, nous nous sommes servi de cultures qui avaient poussé sur gélose de malt à 30° pendant 24 heures; dans les expériences sur *Mycoderma Bordetii* et les deux espèces *Hansenula*, nous sommes parti de levures s'étant développées durant 24 heures à 30° dans la solution nutritive.

La suspension destinée à l'ensemencement des fioles était obtenue en portant à l'aide d'un fil de platine une petite quantité de levure du tube contenant le milieu nutritif solide (gélose de malt) dans un tube à essai qui contenait de l'eau stérile, trois fois distillée. Après avoir très bien agité, on aensemencé les fioles à la pipette avec 1 cm³ de la suspension homogène.

Nous avons obtenu un ensemencement d'une grande précision:

1° En nous servant de pipettes à pointe bien effilée;

2° En remplissant la pipette de la suspension à ensemen-
cer et en la vidant après quelques secondes, avant de commencer l'ensemencement;

3° En remplissant et vidant lentement la pipette. Cette manipulation demandant un certain temps, les chances d'infection s'en trouvaient augmentées. Heureusement, l'infection ne s'est produite qu'exceptionnellement.

Il nous a paru, après de nombreuses expériences, que les récoltes d'une série de fioles de même contenu et ensemencées avec la même quantité d'une certaine levure, en tenant compte de toutes les précautions à prendre, ne différaient généralement les unes des autres que de 5 à 10 p. 100.

En considérant les facteurs intervenant dans ces résultats, il semble bien que les écarts observés doivent provenir de l'ensemencement. Il se peut, en effet, que la suspension dont on est parti, malgré qu'elle ait été bien agitée, ne soit pas entièrement homogène. De plus, les cellules de certaines espèces de levures présentent la propriété de se fixer quelque peu à la paroi de verre de la pipette qui sert à l'ensemencement. C'est, en effet, pour ces espèces (surtout *Rhodotorula Suganii* et, mais de façon moins

marquée, les deux espèces *Hansenula*) que nous avons eu les plus grandes variations.

En tenant compte du degré de précision nous avons obtenu, en moyenne, avec la plupart des espèces de levures, nous avons pris comme règle générale de ne considérer l'action des hormones comme stimulante que dans les cas où, avec certitude, la différence entre la récolte de l'expérience à blanc et celle d'une fiole contenant de l'hormone était de plus de 10 p. 100.

Les résultats des recherches sur l'action des hormones.

1. Expériences avec la folliculine.

Nous avons consacré la plus grande partie de nos expériences à l'étude de l'action possible de l'hormone féminine principale, la folliculine, sur la croissance de la levure.

Il semblait bien possible que la levure, qui contient elle-même des substances se rapprochant de la folliculine, fût influencée par cette hormone.

Nous avons cependant été déçu à ce sujet dans nos premières expériences sur *Torula monosa* et la levure de boulangerie, comme le montrent les chiffres suivants:

Tableau I
Expériences avec la folliculine.

Température: 30°

	Espèce de levure:	
	<i>Torula monosa.</i>	Levure de boulangerie.
Ensemencement en mgr. de matière sèche	2,0	2,5
Temps de croissance en heures	24	23
Récolte en mgr. de matière sèche dans:		
L'expérience à blanc	12,0	6,1
— avec 0 γ 1 d'hormone	12,7	6,5
— — 1 γ —	13,4	6,4
— — 10 γ —	13,3	5,4
— — 50 γ —	13,0	6,0

En répétant ces deux expériences maintes fois (et en employant même l'hormone à sa plus forte concentration, c'est-à-dire 100 γ pour 0 cm³ 1), nous n'avons jamais pu constater une action stimulante.

Pour que l'on puisse observer une influence de l'hormone,

il faut effectuer la détermination avant que la croissance ait atteint son terme.

En général, nous avons satisfait à cette condition et, dans quelques cas, nous l'avons vérifié par l'expérience ¹⁴⁾.

Ensuite, nous avons étudié trois levures appartenant au premier groupe ¹⁵⁾: *Hansenula anomala*, *Hansenula saturnus* et *Mycoderma Bordetii*.

Dans de nombreuses expériences au cours desquelles nous avons veillé à ce que la mesure de la croissance fût faite avant que les éléments nutritifs du milieu de culture soient épuisés, nous n'avons pu non plus constater une action de la folliculine. Les chiffres suivants le démontrent bien.

Tableau II
Expériences avec la folliculine.
Température: 30°

	Espèce de levure:		
	<i>Hansenula anomala.</i>	<i>Hansenula saturnus.</i>	<i>Mycoderma Bordetii.</i>
Ensemencement en mgr. de matière sèche	0,1	0,1	0,1
Temps de croissance en heures	41,5	41,5	19,0
Récolte en mgr. de matière sèche dans:			
L'expérience à blanc	68,7	64,2	36,0
— avec 0 γ 1 d'hormone	63,6	63,1	39,6
— — 1 γ —	68,6	61,9	37,5
— — 10 γ —	68,9	63,7	36,8
— — 50 γ —	63,3	60,3	35,2

Avant d'étendre nos expériences à d'autres levures, nous avons cherché à savoir si une variation du pH du milieu entraînait des résultats positifs. En effet, Schoeller et Goebel ¹⁶⁾, dans leurs recherches sur l'action de la folliculine pure sur les jacinthes, n'obtenaient des résultats positifs que lorsqu'ils ajoutaient en même temps que l'hormone une quantité suffisante de NaOH pour en former le sel de sodium.

Nous avons alors fait plusieurs expériences dans des milieux alcalins de diverses compositions (à pH initial de 8,0) avec la levure de boulangerie, *Torula monosa* et *Hansenula saturnus*. Il ne nous a, cependant, pas été possible d'obtenir dans ces circon-

¹⁴⁾ voir: thèse, p. 44, tableau II.

¹⁵⁾ voir: p. 89.

¹⁶⁾ Schoeller, W. et Goebel, H. Biochem. Z. **272**, 1934, p. 215.

stances une action quelconque de l'hormone en question.

En continuant les expériences dans le milieu usuel, nous avons trouvé que la croissance de *Torulopsis rotundata*, levure incapable de produire du bios, n'était pas influencée par la folliculine.

Les résultats ont été totalement différents quand nous nous sommes adressé pour la première fois à *Rhodotorula Suganii*, levure de coloration rouge. Le tableau suivant en fournit une démonstration nette.

Tableau III
Expériences avec la folliculine.
Température: 30°

		Espèce de levure: <i>Rhodotorula Suganii</i>
Ensemencement en mgr. de matière sèche		0,1
Temps de croissance en heures		94,5
Récolte en mgr. de matière sèche dans:		
L'expérience à blanc		3,2
— avec 0 γ 1 d'hormone		3,1
— — 1 γ —		3,5
— — 10 γ —		17,1
— — 50 γ —		14,3

La petite quantité de 10 γ de folliculine a causé ici une stimulation de la croissance de 434 p. 100.

Très étonné par ce résultat, nous avons immédiatement répété l'expérience, en ensemençant cette fois-ci avec une quantité plus importante de levure afin de diminuer un peu la durée de l'expérience. Voici les chiffres:

Tableau IV
Expériences avec la folliculine.
Température: 30°

		Espèce de levure: <i>Rhodotorula Suganii</i>
Ensemencement en mgr. de matière sèche		0,5
Temps de croissance en heures		63,5
Récolte en mgr. de matière sèche dans:		
1° Expérience à blanc		12,1
2° — —		12,0
— avec 0 γ 1 d'hormone		12,1
— — 1 γ —		11,6
— — 10 γ —		11,3
— — 50 γ —		10,5
— — 100 γ —		9,1

On voit que l'hormone n'a nullement exercé une action stimulante, mais, bien au contraire, à de fortes concentrations, elle a entravé la croissance.

Avant d'en tirer des conclusions, nous avons vérifié ces résultats par plusieurs expériences dont le tableau suivant fournit quelques exemples.

Tableau V
Expériences avec la folliculine.

Température: 30°

	Espèce de levure: <i>Rhodotorula Suganii</i>		
	I	II	III
Ensemencement en mgr. de matière sèche ¹⁷⁾	0,44	0,15	0,03
Temps de croissance en heures	46	88,5	136
Récolte en mgr. de matière sèche dans:			
L'expérience à blanc	1,7	4,9	2,7
— avec 0 γ 1 d'hormone	1,4	4,6	9,0
— — 1 γ —	1,4	9,5	12,0
— — 10 γ —	2,0	16,8	21,4
— — 50 γ —	1,4	22,7	19,9
Stimulation maxima en p. 100	—	363	693

Ayant obtenu ces résultats avec *Rhodotorula Suganii*, il nous a semblé nécessaire d'étudier d'autres levures de coloration rouge. Nous avons commencé ces expériences avec *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi* de couleur rouge corail qui, de même que *Rhodotorula Suganii*, présente dans notre milieu une croissance illimitée.

Comme il apparaît dans les chiffres ci-dessous, nous avons retrouvé pour cette levure, fût-ce dans d'autres proportions, les mêmes phénomènes que dans le cas de *Rhodotorula Suganii*.

¹⁷⁾ La suspension à ensemercer de la 3e Série a été obtenue en diluant celle de la 2e Série.

Tableau VI
Expériences avec la folliculine.
Température: 30°

	Espèce de levure: <i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>Saitoi</i> .		
	I	II	III
Ensemencement en mgr. de matière sèche ¹⁸⁾	0,58	0,45	0,15
Temps de croissance en heures	43,5	43	68,5
Récolte en mgr. de matière sèche dans:			
L'expérience à blanc	8,1	8,8	4,5
— avec 0 γ 1 d'hormone	7,9	9,5	5,6
— — 1 γ —	8,2	10,0	6,9
— — 10 γ —	8,9	10,7	7,5
— — 50 γ —	9,3	12,0	12,7
Stimulation maxima en p. 100	15	36	182

En continuant ces expériences, nous avons obtenu une vérification complète de ce qui a été observé plus haut.

Nos expériences ont montré que la folliculine n'agit pas sur la croissance des six levures incolores, alors qu'elle présente une influence nette sur les deux levures de coloration rouge. Il semblait donc que la folliculine agit de préférence sur les levures pigmentées.

Afin d'étudier ce point de plus près, nous avons choisi les différentes levures pigmentées:

Rhodotorula longissima, *Rhodotorula bronchialis*, *Rhodotorula sanniei*, *Rhodotorula rubra* var. *longa* et *Rhodotorula flava*.

Comme il a déjà été mentionné plus haut, les deux premières levures pouvaient pousser indéfiniment sur notre milieu, alors que les autres, en l'absence de bios, n'y présentaient qu'une croissance limitée.

Or, nous n'avons jamais pu constater, au cours des nombreuses expériences, une action quelconque de la folliculine sur ces levures.

Si l'on recherche les principales différences entre ces levures, d'une part, *Rhodotorula Suganii* et *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*, d'autre part, on remarque que *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi* et surtout *Rhodotorula Suganii* poussent bien plus lentement que les autres ¹⁹⁾.

¹⁸⁾ voir la note précédente.

¹⁹⁾ voir: thèse, p. 52 tableau XIII.

On pourrait en conclure que l'action de l'hormone ne se fait sentir que pour une vitesse de croissance donnée, assez petite.

Pour vérifier cette considération, nous avons effectué diverses expériences dans lesquelles nous ramenions la vitesse de croissance de *Rhodotorula bronchialis*, par des variations de température, à peu près à celle de *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi* à 30°. Il ne nous a cependant pas été possible de constater dans ces circonstances une influence perceptible de la folliculine.

Le ralentissement de la croissance de *Rhodotorula bronchialis* ne nous fournissant pas d'argument en faveur de notre hypothèse, nous avons essayé d'y arriver par la méthode opposée, à savoir: en accélérant la croissance de *Rhodotorula Suganii* et *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*.

Il n'a pas été possible d'obtenir ce résultat par une élévation de la température, mais nous y avons réussi par un autre moyen.

Plusieurs fois déjà, nous nous étions rendu compte qu'après de nombreux repiquages dans notre solution nutritive, ces levures présentaient une croissance de plus en plus rapide. Cette accoutumance au milieu se voit fréquemment chez les micro-organismes.

Nous avons alors effectué vingt repiquages sur milieu de Reader complété; ainsi nous avons obtenu dans ce milieu une vitesse de croissance environ 6 fois plus grande, en ensemençant avec ces levures, qu'avec celles toujours cultivées sur gélose de malt ²⁰⁾.

Ensuite nous avons recherché l'action de la folliculine sur les deux cultures ainsi modifiées. Les résultats obtenus ont été complètement négatifs.

Dans quelques cas, nous avons fait desensemencements exceptionnellement clairsemés (à savoir: ± 0 mgr. 005 de matière sèche), mais, là encore, il ne nous a pas été possible de constater une action de la folliculine.

Nous avons cherché alors à savoir si les cultures, modifiées par les repiquages successifs sur milieu de Reader complété, reprenaient leurs anciennes propriétés si on les repiquait quotidiennement pendant quelques semaines sur gélose de malt.

Après avoir subi pendant trois semaines ce traitement, ces cultures présentaient encore dans notre milieu une vitesse de croissance bien supérieure à celles qui avaient toujours poussé

²⁰⁾ voir: thèse, p. 53, tableau XIV.

sur gélose de malt. L'hormone n'accélérait pas leur croissance. En résumant les résultats obtenus avec la folliculine, nous remarquons que, sur les 13 espèces de levures, étudiées par nous, deux seulement subissent une action stimulante de l'hormone. Ces deux levures (*Rhodotorula Suganii* et *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*) sont de coloration rouge. La folliculine n'agit que pour une vitesse de croissance donnée et pour un ensemencement de moins de 0 mgr. 6 de matière sèche environ pour 50 cm³ du milieu nutritif.

Comment peut-on expliquer ce fait?

Ces dernières années, on a observé pendant la période d'incubation des variations du potentiel d'oxydo-réduction du milieu. Il semble qu'au moment où la croissance débute, ce potentiel a atteint une certaine valeur qui reste constante pendant la période de l'accroissement logarithmique.

Il a paru que, pendant la période d'incubation, les cellules de levures émettent en milieu synthétique certains systèmes d'oxydo-réduction, ce qui entraîne une variation du potentiel du milieu jusqu'à ce que ce dernier ait atteint le niveau nécessaire à la croissance.

Si l'on admet que le milieu doit contenir par unité de volume une quantité donnée de ces systèmes, pour que la croissance d'une certaine levure puisse commencer, il s'ensuivra que la période d'incubation diminue proportionnellement à l'augmentation de la quantité de cellules par unité de volume. Ce fait a été vérifié par l'expérience.

Appliquons ces considérations aux phénomènes que nous avons observés; on peut dire alors que la folliculine favorise l'établissement du potentiel d'oxydo-réduction nécessaire à la croissance dans le cas d'un ensemencement dilué. Si l'ensemencement se fait avec une suspension concentrée, ce potentiel est si rapidement atteint sous l'influence du grand nombre de cellules par unité de volume que l'hormone reste sans action.

Quelle est exactement la nature de l'action de la folliculine?

En premier lieu, elle pourrait agir en tant que système d'oxydo-réduction. Dans la littérature on ne trouve cependant aucun cas où l'hormone agirait de cette façon. De plus les concentrations auxquelles elle agit (nous avons déjà observé une influence nette à 1 γ pour 50 cm³ de liquide nutritif) seraient certainement bien trop faibles.

Il est plus vraisemblable d'admettre que la folliculine agit directement sur les cellules en les stimulant; celles-ci émettent alors dans le milieu de culture une plus grande quantité de systèmes d'oxydo-réduction par unité de temps, ce qui entraîne une diminution de temps d'incubation.

Nous verrons ensuite que les considérations données ci-dessus s'appliquent également à l'action d'autres hormones sur nos levures.

2. Expériences avec le benzoate de dihydrofolliculine.

Il semblait raisonnable de s'attendre à des résultats analogues avec le benzoate de dihydrofolliculine, substance qui se rapproche tant de la folliculine aux points de vue chimique et physiologique. Ces deux hormones ne diffèrent que par l'intensité de leur action sur l'organisme humain et animal. Ainsi, le benzoate de dihydrofolliculine est deux fois plus actif que la folliculine dans la formation de l'oestrus chez les souris.

Nous avons étudié son action sur les levures suivantes:

Torula monosa, levure de boulangerie (culture pure), *Hansenula saturnus*, *Hansenula anomala*, *Mycoderma Bordetii*, *Torulopsis rotundata*, *Rhodotorula Suganii*, *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi* et *Rhodotorula bronchialis*.

De même que pour les expériences avec la folliculine, nous n'avons obtenu, après de nombreux essais, un résultat positif que pour *Rhodotorula Suganii* et *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*. Nous n'avons pas trouvé que le benzoate de dihydrofolliculine fût plus actif que la folliculine. Le tableau suivant donne une vue d'ensemble de quelques chiffres obtenus.

Tableau VII

Expériences avec le benzoate de dihydrofolliculine.

Température: 30°

	Espèce de levure:			
	<i>Rhodotorula Suganii</i>		<i>Rhodotorula glutinis</i>	
Ensemencement en mgr. de matière sèche . . .	0,62	0,12	0,59	0,10
Temps de croissance en heures	45,5	89,5	41,5	48
Récolte en mgr. de matière sèche dans:				
L'expérience à blanc	3,5	14,8	9,0	5,6
— avec 0 γ 1 d'hormone	3,3	15,8	9,2	5,5
— — 1 γ —	3,3	18,9	9,3	5,5
— — 10 γ —	4,2	20,5	10,0	7,3
— — 50 γ —	4,2	23,5	10,0	8,1
— — 100 γ —	5,0	23,5	8,4	8,1
Stimulation maxima en p. 100	40	59	11	45

De même que la folliculine, le benzoate de dihydrofolliculine favorise la croissance pour des ensemencements d'une concentration inférieure à une certaine limite (ici 0 mgr. 7 de mat. sèche environ).

3. Expériences avec la testostérone.

L'influence sur la croissance des plantes de l'hormone sexuelle femelle a été maintes fois mentionnée dans la littérature. Des recherches sur l'action de l'hormone sexuelle mâle ne nous sont point connues.

En nous appuyant sur les expériences précédentes, nous avons choisi pour ces recherches: *Rhodotorula Suganii*, *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*, *Rhodotorula bronchialis* et *Hansenula saturnus*.

Ici, de même, nous avons constaté que seule la croissance de *Rhodotorula Suganii* et *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi* subit une action stimulante.

Voici les résultats de quelques-unes de nos expériences.

Tableau VIII
Expériences avec la testostérone.

Température: 30°

	Espèce de levure:	
	<i>Rhodotorula Suganii</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
Ensemencement en mgr. de matière sèche	0,14	0,1
Temps de croissance en heures	89	65,5
Récolte en mgr. de matière sèche dans:		
L'expérience à blanc	4,6	5,3
— avec 0 γ 1 d'hormone	4,7	5,2
— — 1 γ —	7,7	5,8
— — 10 γ —	10,8	6,3
— — 50 γ —	15,6	8,4
Stimulation maxima en p. 100	239	58

On remarque, d'après ce tableau, que l'action stimulante qui se fait sentir surtout chez *Rhodotorula Suganii*, est du même ordre de grandeur que celle obtenue avec la folliculine.

4. Expériences avec l'androstérone.

Nous avons évidemment choisi pour ces expériences, en plus de *Rhodotorula bronchialis*, les deux levures qui nous ont toujours fourni des résultats si intéressants: *Rhodotorula Suganii* et *Rhodotorula glutinis* var. *saitoi*.

On trouvera dans le tableau suivant quelques-uns des résultats obtenus :

Tableau IX
Expériences avec l'androstérone.

Température: 30°

	Espèce de levure :	
	<i>Rhodotorula Suganii</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
Ensemencement en mgr de matière sèche	0,12	0,10
Temps de croissance en heures	89	64,5
Récolte en mgr. de matière sèche dans :		
L'expérience à blanc	4,2	8,6
— avec 0 γ 1 d'hormone	4,5	9,0
— — 1 γ —	5,6	10,2
— — 10 γ —	5,7	10,7
— — 50 γ —	6,2	12,2
Stimulation maxima en p. 100	48	42

On voit que l'action de l'androstérone sur la croissance de *Rhodotorula Suganii* est bien moins importante que celle de la testostérone. Ce fait présente un certain intérêt puisqu'on a observé le même rapport entre les actions de ces deux hormones sur l'animal.

5. Expériences avec l'insuline.

Quoique nous nous fussions proposé de n'étudier que l'action d'hormones chimiquement pures, nous avons fait une exception pour l'insuline dont on ne connaît pas encore la composition exacte.

Nous nous sommes servi, dans ces recherches, de deux préparations différentes d'insuline, l'une cristallisée, l'autre amorphe. Nous n'avons pu observer aucune différence d'action entre ces deux produits.

L'action de l'insuline a été étudiée sur sept de nos cultures de levure: *Torula monosa*, levure de boulangerie, *Torulopsis rotundata*, *Rhodotorula Suganii*, *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*, *Rhodotorula flava* et *Rhodotorula bronchialis*.

Ayant effectué un grand nombre d'expériences, nous n'avons observé une influence, et uniquement à de fortes concentrations, que sur *Rhodotorula Suganii* et *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*.

Voici quelques-uns des chiffres obtenus :

Tableau X
Expériences avec l'insuline.
Température: 30°

	Espèce de levure :	
	<i>Rhodotorula Suganii</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
Ensemencement en mgr. de matière sèche	0,15	0,15
Temps de croissance en heures	91,5	65,5
Récolte en mgr. de matière sèche dans :		
L'expérience à blanc	7,8	8,7
— avec 1 γ d'hormone	8,2	8,9
— — 10 γ —	8,6	9,6
— — 50 γ —	11,0	9,2
— — 100 γ —	15,1	9,6
Stimulation maxima en p. 100	94	10

Nous avons insisté plus haut sur le fait que les résultats des différentes fioles peuvent varier de 10 p. 100 en dehors de toute action hormonale. Mais ayant observé une certaine régularité dans les résultats obtenus avec *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*, nous nous sommes cru autorisé à parler ici d'une faible stimulation.

6. Expériences avec l'adrénaline.

Pour ces expériences, nous avons employé la culture pure de levure de boulangerie, *Hansenula saturnus*, *Rhodotorula Suganii*, *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi* et *Rhodotorula bronchialis*. On y ajoutait l'adrénaline sous forme de chlorhydrate, à des concentrations de 0 γ 1, 1 γ , 10 γ , 50 γ et 100 γ pour 0 cm³ 1 d'alcool à 98 p. 100.

Dans aucun cas nous n'avons pu observer une action stimulante sur la formation de matière sèche par les levures ci-dessus énumérées.

7. Expériences avec la thyroxine.

Il a paru, d'après certains auteurs, que la thyroxine agit, dans quelques cas, en inhibant le processus de division cellulaire; elle peut également influencer la fermentation alcoolique.

Dans nos expériences, nous avons étudié l'action du sel potassique de la thyroxine à différentes concentrations sur

Rhodotorula Suganii, *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi* et *Rhodotorula bronchialis*.

De même que pour toutes les expériences précédentes, nous n'avons pu constater une action manifeste que pour *Rhodotorula Suganii* et *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*. Des chiffres qui vont suivre on peut conclure que la thyroxine ne stimulait que très faiblement cette dernière levure.

Tableau XI
Expériences avec la thyroxine.

Température: 30°

	Espèce de levure:	
	<i>Rhodotorula Suganii</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
Ensemencement en mgr. de matière sèche	0,15	0,1
Temps de croissance en heures	91,5	45
Récolte en mgr. de matière sèche dans:		
L'expérience à blanc	7,9	5,8
— avec 0 γ 1 d'hormone	7,6	6,1
— — 1 γ —	7,8	5,7
— — 10 γ —	8,2	6,4
— — 50 γ —	13,6	6,8
Stimulation maxima en p. 100	72	17

On voit que la thyroxine peut augmenter la formation de matière sèche par la levure. L'aspect des cellules ne se trouvant pas modifié sous l'influence de cette hormone, la thyroxine n'entrave pas la multiplication cellulaire (par bourgeonnement) de ces deux levures.

8. Expériences avec l'hétéro-auxine.

En dernier lieu, nous avons étudié l'hétéro-auxine, hormone végétale (acide indolyl-3-acétique).

On a pensé d'abord que cette substance n'agit que sur l'élongation des cellules végétales; des recherches récentes ²¹⁾ ont cependant démontré que l'hétéro-auxine pouvait également exercer une influence sur la division cellulaire.

Pour ces expériences nous nous sommes servi des espèces suivantes:

Torula monosa, levure de boulangerie (culture pure), *Toru-*

²¹⁾ Gouwentak, C. A. et Hellinga, G. Meded. Landbouwhoogeschool Wageningen, t. 39, 1935, No. 6.

lopsi rotundata, *Hansenula anomala*, *Hansenula saturnus*, *Mycoderma Bordetii*, *Rhodotorula Suganii*, *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi* et *Rhodotorula bronchialis*.

Les concentrations de l'hétéro-auxine que nous avons employées étaient de 1 γ , 10 γ , 50 γ et 100 γ par 0 cm³ 1 d'alcool à 98 p. 100.

De toutes les cultures étudiées, seule celle de *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi* a été faiblement influencée (Stimulation maxima 19 p. 100).

La stimulation observée est trop faible pour pouvoir affirmer que l'hétéro-auxine présente une influence positive sur la reproduction de cette levure.

Quelques observations.

Nous n'avons jamais constaté avec certitude à l'examen microscopique des cellules vivantes des modifications morphologiques appréciables de celles-ci, sous l'influence des hormones que nous avons étudiées.

Remarquons que nos examens revêtent un caractère très provisoire, et que seules des recherches approfondies peuvent fournir une certitude dans cette question.

Nous nous sommes demandé dans quelle mesure l'action stimulante des hormones dépend de la quantité administrée ²²⁾. En examinant la plupart des résultats obtenus, on voit qu'en général la concentration la plus faible (0 γ 1) n'exerce aucune influence; l'action observée avec une concentration de 1 γ est toujours supérieure à celle obtenue par γ dans le cas des concentrations plus fortes.

L'Influence de certains métalloïdes et métaux sur l'action stimulante de la folliculine.

Nous avons vu que l'action stimulante de la folliculine (et d'autres hormones) ne se manifeste que chez deux levures pigmentées qui présentent dans notre milieu, par repiquages successifs, un développement indéfini, et pour une vitesse de croissance bien déterminée de celles-ci.

²²⁾ voir: thèse, pp. 66 et 67.

Nous montrerons par ce qui va suivre que l'action hormonale dépend encore d'autres facteurs.

En collaboration avec M. G. Bertrand ²³⁾, nous nous sommes posé la question du rôle que jouaient les éléments actifs de notre milieu dans l'action stimulante que nous avons observée avec la folliculine.

Dans ces expériences nous avons étudié la croissance de la levure qui s'y prête le mieux, à savoir: *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*, dans quatre milieux différents:

- I. Le milieu de Reader seul.
- II. Le milieu de Reader + 1 mgr. de zinc par litre.
- III. Le milieu de Reader + 1 mgr. de thallium + 1 mgr. de manganèse + 0 mgr. 1 de cuivre + 1 mgr. d'iode + 1 mgr. de bore par litre.
- VI. Le milieu III + 1 mgr. de zinc par litre.

Dans chacun de ces milieux nous avons effectué deux séries d'expériences: l'une à blanc, l'autre avec 50 γ de folliculine.

Comme toujours, chaque fiole contenait 50 cm³ de liquide nutritif, et elle étaitensemencée avec 1 cm³ d'une suspension de culture de vingt-quatre heures sur malt gélosé, qui renfermait 0 mgr. 1 de matière sèche. Nous avons ainsi obtenu les résultats suivants:

Tableau XII
Expériences avec la folliculine.
Température: 30°

	Espèce de levure:	
	<i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>Saitoi</i>	
Ensemencement en mgr. de mat. sèche	0,1	0,1
Temps de croissance en heures	51,5	51,5
Récolte en mgr de mat. sèche dans:	le milieu I	le milieu II
L'expérience à blanc	3,0	3,1
L'expérience avec 50 γ d'hormone	3,1	6,4
Stimulation en p. 100	—	106

On voit qu'en l'absence de zinc aucune stimulation ne s'est produite.

D'après les chiffres obtenus dans les deux expériences à blanc, il apparaît que la croissance de la levure est normale en

²³⁾ Bertrand, G. et Weber, A. Ph. Compt. rend. **202**, 1936, p. 1629.

l'absence de zinc et que la présence de ce corps ne la stimule nullement.

Le zinc étant considéré par différents auteurs comme indispensable au développement de la levure, il faudra conclure des chiffres obtenus que le milieu de Reader, malgré la purification de ses constituants, contient encore une quantité suffisante de zinc pour permettre la croissance de cet organisme.

Nous avons ensuite cherché à savoir si, en dehors du zinc, l'action stimulante de la folliculine dépend d'autres éléments actifs.

On trouvera dans le tableau suivant les résultats de ces expériences.

Tableau XIII
Expériences avec la folliculine.

Température: 30°

	Espèce de levure:		
	<i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>Saitoi</i>		
Ensemencement en mgr. de mat. sèche .	0,1	0,1	0,1
Temps de croissance en heures . . .	53	53	53
Récolte en mgr. de mat. sèche dans:	milieu I	milieu III	milieu IV
L'expérience à blanc	3,8	4,0	4,8
— avec 50 γ d'hormone .	4,4	5,0	8,6
Stimulation en p. 100	16	25	79

En l'absence des éléments actifs, la stimulation produite par la folliculine est minime; celle-ci augmente quand on ajoute du thallium, du manganèse, du cuivre, de l'iode et du bore; mais elle n'est vraiment très prononcée qu'en présence du zinc.

En examinant les récoltes obtenues dans les expériences à blanc, on note que le zinc semble avoir manifesté, là aussi, une action, quoique moins importante. Nous avons enfin contrôlé et étendu les résultats ci-dessus par l'expérience suivante:

Tableau XIV
Expériences avec la folliculine.
Température: 30°

	Espèce de levure:			
	<i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>Saitoi</i>			
Ensemencement en mgr. de matière sèche . . .	0,1	0,1	0,1	0,1
Temps de croissance en heures	67	67	67	67
Récolte en mgr. de mat. sèche dans:	milieu I	milieu II	milieu III	milieu IV
L'expérience à blanc.	3,3	3,6	3,4	4,0
— avec 50 γ d'hormone	3,7	9,0	9,8	14,4
Stimulation en p. 100 .	12	150	178	260

On constate ici, quoique dans une autre mesure, les mêmes phénomènes remarqués plus haut. Nos résultats prouvent donc que l'action de la folliculine sur *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi* ne se fait nettement sentir que si le milieu de culture contient certains métalloïdes et métaux en petites quantités. Parmi ces éléments, c'est le zinc qui est le plus important.

CONCLUSIONS

En étudiant le problème de l'action possible des hormones (à l'état pur) sur la croissance de la levure dans un milieu nutritif purement synthétique, nous avons constaté les points suivants:

I° La détermination quantitative de la croissance de la levure (formation de matière sèche), telle que nous l'avons effectuée, a fourni, contrairement aux autres méthodes préconisées, des résultats suffisamment précis.

II° Les récoltes obtenues dans des fioles contenant le même milieu, etensemencées avec la même quantité d'une suspension de levure donnée, présentent, si l'on prend toutes les précautions nécessaires, des différences de 5 à 10 p. 100 entre elles.

III° L'opinion de Richards, d'après laquelle le bios de Wildiers ne serait que du thallium, ne saurait être justifiée, puisque six espèces de levures n'ont manifesté dans notre solution nutri-

tive, qui contenait du thallium, qu'une croissance limitée si l'on ne prenait soin d'y ajouter une petite quantité de moût de bière.

IV° Sur les treize espèces de levure étudiées par nous, nous n'avons noté une stimulation de la formation de matière sèche par l'action des hormones que pour *Rhodotorula Suganii* et *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*. Ces deux espèces présentent une pigmentation rouge; elles peuvent, par repiquages successifs, pousser indéfiniment sur notre milieu de culture synthétique.

V° Nous avons étudié les hormones suivantes: la folliculine, le benzoate de dihydrofolliculine, la testostérone, l'androstérone, l'insuline, l'adrénaline, la thyroxine et l'hormone végétale l'hétéro-auxine.

VI° La folliculine, le benzoate de dihydrofolliculine et la testostérone à des concentrations de 0,0001 p. 100 agissent en stimulant fortement la formation de matière sèche des deux espèces de levures nommées plus haut; l'androstérone s'est montrée moins active. L'insuline et la thyroxine à la même concentration stimulent de façon appréciable la croissance de *Rhodotorula Suganii*, faiblement celle de *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*. L'adrénaline ne présente pas d'action manifeste et l'hétéro-auxine stimule dans une faible mesure le développement de *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi* seulement.

VII° L'action stimulante disparaît quand on ensemence les fioles avec une quantité de levure correspondant à 0 mgr. 6 de matière sèche environ. L'addition d'une plus grande quantité d'hormone reste sans effet. L'influence de l'hormone se manifeste au-dessous de cette limite et la stimulation augmente quand la quantité de cellules à ensemercer diminue.

VIII° De même, l'action stimulante de l'hormone disparaît quand on accélère, par des repiquages successifs dans notre milieu, la croissance de *Rhodotorula Suganii* et de *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*. Cette action dépend donc de la vitesse de croissance.

IX° En tenant compte du rapport existant entre la concentration des cellules après l'ensemencement et la mesure dans laquelle l'hormone stimule, on peut admettre que cette substance favorise l'établissement du potentiel d'oxydo-réduction, nécessaire à la croissance. La folliculine n'agit vraisemblablement pas

en tant que système d'oxydo-réduction, mais plutôt par une stimulation directe de la cellule.

X° En étudiant la signification de la présence de certains éléments minéraux dans notre milieu de culture dans le cas de la folliculine agissant sur *Rhodotorula glutinis* var. *Saitoi*, nous avons remarqué que la stimulation n'a pas lieu ou se manifeste très faiblement quand on opère dans le milieu de Reader. Dès que l'on ajoute 1 mgr. de zinc par litre à ce milieu, l'hormone possède une influence appréciable, qui se trouve encouree augmentée par addition des autres éléments contenus dans notre milieu habituel (à savoir: thallium, manganèse, cuivre, iode et bore).

Qu'il nous soit permis d'exprimer ici toute notre gratitude à M. le prof. G. Bertrand pour le bienveillant accueil qu'il nous a réservé dans son laboratoire célèbre; à M. le prof. S. C. J. Olivier (Wageningen, Hollande) et à M. le prof. A. J. Kluyver (Delft, Hollande) pour les grands services qu'ils ont bien voulu nous accorder; à la société néerlandaise „Fondation Pasteur”, qui nous a donné les moyens de pouvoir, pendant deux ans, effectuer ces recherches à l'Institut Pasteur de Paris.

Remercions tout spécialement Mlle J. F. Heuvelink, pour son aide précieuse dans ce travail.

Paris, Institut Pasteur, laboratoire
de chimie biologique, juillet 1936.

Bockaankondiging.

Dr. Th. H. Schlichting: Louis Pasteur, een schets van zijn leven en zijn werken. Uitgeverij Het Spectrum; z. j., 95 blz.

Dit boekje is bedoeld te zijn: het zevende nummer van de Eerste Reeks van de Serie *Schijnwerpers*.

Alweer een geschrift over Pasteur zal men zeggen, zijn er dan nog niet genoeg verschenen? Hebben niet vele van deze levensschetsen het licht gezien toen het 100 jaar geleden was, dat Pasteur het levenslicht aanschouwde?

Ziet hier juist óók de gedachte, welke zich aan mij opdrong, toen ik mij zette, om het boekje te lezen. Het gevolg daarvan is echter verrassend geweest, daar ik tot de overtuiging kwam, dat er over dezen man niet genoeg gezegd en geschreven kan worden, omdat zijn leven en zijn werken van zulk een groote, zedelijke waarde blijken te zijn, dat het alleen reeds daarom wenschelijk is, dat zij door velen worden gekend en begrepen.

Zeker, de geschiedenis van den grondlegger der microbiologie was mij reeds van andere zijde verteld geworden, maar zij blijft mij telkens treffen en ook telkens boeien. En daarbij, wat niet een vormende en opvoedende kracht gaat er van uit, zooals trouwens in het algemeen uitgaat van het zich verdiepen in het werk der ouderen, maar die juist in zoo hooge mate is te vinden in den arbeid van dezen onsterfelijken Franschman.

De inhoud van het boek is dan ook voortreffelijk, dat behoeft geen nader betoog, hier dient het veeleer de vorm te zijn, waarin die rijke inhoud werd gegoten, waarover te spreken valt.

Het geschrift munt uit door groote beknoptheid; werd geschreven in een stijl, welke men de telegrafische heeft geheeten. Bovendien het is vóór alles populair, gaat nergens diep op in, maar toch voldoende, om juist te doen beseffen de waarde en de grootheid van gedachte en van experiment. Ongetwijfeld zal het den ontwikkelden leek onder den indruk van het wrochten van dien onvergankelijken geest brengen.

Het boek is bovendien niet in zuivere, objectieve geschiedkundige lijn gehouden, zoo nu en dan treedt de schrijver zeer subjectief op, hekelt hij, geheel volgens zijn inzicht en gevoelens, heerschende opvattingen en levensbeschouwingen, dogma's en wetenschappelijke modes. Het conservatisme en het stille verzet, dat ook heden ten dage nog wel eens van geneeskundige zijde, maar niet steeds sympathiek, ons tegentreedt, indien het de beoordeeling betreft van medische of verwante vraagstukken door hen, die nu eenmaal niet in het bezit van een artsdiploma zijn, wordt ons geenszins verbloed, maar wordt evenmin geprezen.

Hoewel een klein en bescheiden boekje, spreken wij toch de hoop uit, dat het zijn weg zal weten te vinden, dat het zal aansporen en opwekken naar uitvoeriger werken over het leven en den arbeid van Pasteur te grijpen. Trouwens in zijn voorwoord heeft de schrijver daarvan een drietal met name genoemd, welke hem bovendien als bronnen bij de samenstelling van zijn geschrift hebben gediend.

Moge vele jongeren zich daartoe geroepen gevoelen die, naar het mij toeschijnt, nog zoo ontzettend veel van de vroegere generaties kunnen en hebben te leeren en die daardoor met eerbied zullen worden vervuld voor hetgeen zij ons hebben nagelaten.

de G.

VERSLAG

der Vergadering van de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie, gehouden ZATERDAG 22 MEI 1937 in het Phytopathologisch Laboratorium Javalaan 4 te Baarn.

Volgens de presentielijst zijn aanwezig 45 leden en 8 gasten. Bij afwezigheid van den Voorzitter, opent de Secretaris te kwart over tien de vergadering, waarbij eerst de ingekomen stukken ter behandeling komen. Deze zijn:

- 1e. Het Nederlandsch Natuur- en Geneeskundig Congres verzoekt de Vereeniging lid te worden om op deze wijze bij te dragen in de kosten van de voorbereidende werkzaamheden ter inventarisatie van de Nederlandsche boekerijen, waartoe onze Vereeniging reeds een medisch lid in de commissie van voorbereiding der geneeskundige wetenschappen benoemd heeft. Aldus wordt na eenige discussie besloten.
- 2e. De stichting voor Biophysica, waarin de Vereeniging een vertegenwoordiger in den Raad van Beheer heeft benoemd, vraagt een jaarlijksche bijdrage. Besloten wordt na eenige discussie het bedrag der jaarlijksche bijdrage aan de diligentie van het Bestuur over te laten.
- 3e. De verhouding der Vereeniging tot de Internationale Vereeniging voor Microbiologie.
Overeenkomstig het, door den Voorzitter in de vorige vergadering gedaan verzoek, heeft Prof. Kluyver nader onderzocht, hoe te bereiken zou zijn, dat de Ned. Ver. v. Microbiologie in de toekomst zou kunnen optreden als het nationale vertegenwoordigende lichaam in de „International Association of Microbiologists”. Op grond van de ingewonnen inlichtingen is gebleken, dat dit naar alle waar-

schijnlijkheid kan worden bereikt indien aan Dr. Th. M. Rivers, den Voorzitter van het 3de Internationale Congres voor Microbiologie een schrijven wordt gericht in den geest van een door Prof. Kluyver opgesteld concept. De secretaris leest dit concept voor, de vergadering vereenigt zich met het voorstel van het Bestuur.

- 4e. Een lijst van zeldzame boeken, enz. op het gebied van Entomologie uit de bibliotheek van Major E. C. Austen.
- 5e. Twaalfde jaarverslag 1935 van de Koningin Wilhelminastichting met lijst van publicaties.
- 6e. Het 5e Bosscha-nummer van het Geneesk. Tijdschrift voor Nederlandsch Indië.
Enkele leden zonden bericht van verhindering.

Verslag van den secretaris.

De secretaris, Dr. T. Folpmers, deelt mede, dat het aantal gewone leden thans 129 bedraagt, terwijl het aantal temporeaire leden is toegenomen tot 7. Op 23 Mei 1936 werd de zomer-vergadering gehouden in het Gemeente Ziekenhuis aan de Zuidwal te 's Gravenhage. Ze werd bijgewoond door 54 leden en 12 gasten. Nadat in de ochtendvergadering het wetenschappelijk gedeelte was behandeld, vond een gemeenschappelijk noenmaal plaats in huize Anjema, waarna bij de feestelijke herdenking van het 25-jarig bestaan verschillende feestredenaars het woord voerden. Bij de wintervergadering op 14 November in het Hygiënisch Laboratorium te Utrecht waren 53 leden en 7 gasten aanwezig. In deze vergadering trad onze bekende secretaris, dr. van Nederveen af, die 11 jaren lang zijn taak met eere vervuld heeft. De voorzitter brengt in eenige treffende woorden de groote verdienste van den afgetreden secretaris tot uiting, waarmede de geheele vergadering instemt.

Verslag van de penningmeesteres.

Bij afwezigheid door ziekte wordt het geldelijk verslag over 1936 uitgebracht door den secretaris. Het verlies over 1936 bedraagt f 110.67, veroorzaakt door de viering van het 25-jarig bestaan der vereeniging.

BALANS PER 31 DECEMBER 1936.

BEZITTINGEN:

Saldo spaarbank . . .	f 2347.41
Saldo postrekening . . .	„ 13.91
Kas	„ 18.60
	f 2379.92

SCHULDEN:

Tijdschrift	f 967.50
Saldobezit	„ 1412.42
	f 2379.92

Saldobezit op 31 Dec. 1936 . . . f 1412.42

Saldobezit op 31 Dec. 1935 . . . „ 1523.09

Verlies over 1936 . . . f 110.67

Overzicht der Inkomsten en Uitgaven over 1936.

INKOMSTEN:

Saldo 1 Jan. 1936 . . .	f 2445.59
Aan contributie . . .	„ 1097.50
Rente over 1936 . . .	„ 68.37
	f 3611.46

UITGAVEN:

Tijdschrift 1935 . . .	f 922.50
Prof. de Jongfonds . .	„ 50.—
Biologische Raad . . .	„ 25.—
Onkosten secretaris . .	„ 31.43
Onkosten penningm.esse „	7.88
Retour teveel bet. contr. „	5.—
Vergaderingen	„ 189.73
Saldo 1 Jan. 1937 . . .	„ 2379.92
	f 3611.46

BEGROOTING VOOR 1937.

INKOMSTEN:

Contributie 129 leden . .	f 1161.—
Contr. 7 temp. leden . .	„ 17.50
Rente	„ 71.—
	f 1249.50

UITGAVEN:

Tijdschrift	f 967.50
Prof. de Jong-fonds . .	„ 50.—
Biologische Raad . . .	„ 25.—
Onkosten secretaris . .	„ 50.—
Onkosten penningm.esse „	15.—
2 Vergaderingen . . .	„ 100.—
Onvoorzien	„ 12.—
Batig saldo	„ 30.—
	f 1249.50

Najaarsvergadering.

Besloten wordt deze te houden op Zaterdag 13 November in het Laboratorium voor de Gezondheidsleer te Amsterdam.

Bij de rondvraag verlangt niemand het woord en derhalve wordt overgegaan tot het

Wetenschappelijk programma.

De eerste voordracht wordt gehouden door Dr. R. Th. Scholtens (Utrecht) over: De smooth-rough variatie van de typhus-bacil. Deze voordracht komt in zijn geheel in het tijdschrift.

Bij de gedachtenwisseling merkt Dr. Den Dooren de Jong op, dat agglutinatie door serologen als iets merkwaardigs wordt beschouwd. Zijn indruk is, dat dit juist iets normaals is, terwijl het in-suspensie-blijven juist iets bijzonders is, daar een gehydrateerd en negatief colloïd, waarmee een bacterie is te vergelijken, door physiologische zoutoplossing behoort uit te vlokken.

Dr. Tasman is het daarmee niet eens, doch zegt, dat men voor agglutinatie twee factoren noodig heeft.

- 1e. combinatie van het op elkaar passend antigeen en antistof.
- 2e. een zekere electrolytconcentratie.

Voegt men bij een typhus-bacteriënsuspensie b.v. normaal paardenserum, dan treedt, ondanks de aanwezigheid van zout, *geen* agglutinatie op. Omgekeerd is de combinatie antigeen-antistof *alleen* voor agglutinatie niet voldoende. Een en ander is te vergelijken met de uitvlokking van een zetmeelsol, waarvoor zoowel dehydratie (alcohol) als ontlading (zout) noodig is. Agglutinatie, respect. auto-agglutinatie is dus niet iets vanzelfsprekends.

Prof. Dr. J. J. van Loghem (Amsterdam) sprak daarna over: Bacteriële veranderlijkheid als normale en ziekelijke functie. Ook deze voordracht verschijnt in het tijdschrift. Bij de gedachtenwisseling vraagt J. Mulder of Prof. van Loghem in de praktijk het woord „type” wil laten vallen, speciaal wat betreft de pneumococcen-typen en hoe hij zich het geno-type van een pneumococcus voorstelt? Dr. Tasman stelt de vraag: „Indien men het onderscheid tusschen de verschillende pneumococcen-typen

zoeken moet in chemisch verschillend opgebouwde polysacchariden, neemt spreker dan nog aan, dat deze „typen” terug te voeren zijn op één genotype van „pneumococcus”?”

Prof. van Loghem beantwoordt de gemaakte opmerkingen ongeveer als volgt:

De aanduiding „type” heeft zich wel zeer ingeworteld, zoodat het niet zoo gemakkelijk zal zijn dit onjuiste woord, dat in de biologie trouwens reeds meer dan ééne beteekenis heeft, op te ruimen. De voorstelling van de genotypische constitutie beperkt zich tot een abstractie. Wat den pneumococcus betreft, heeft men den aanleg voor alle adaptatieve toestanden als gelijk te aanvaarden: de phaenotypus omvat dus alle zoogenaamde „typen” (fixaten).

Welke de prikkels zijn, die tot deze gefixeerde vormen leiden, is nog slechts ten deele bekend (Griffith, Neufeld, e.a.). Geheel onzeker voelt spreker zich nog ten opzichte van de pathologische en epidemiologische betrekking. Vindt men bij een bepaalden vorm van pneumococcose vooral een bepaald fixaat, moet men dan aannemen, dat dit als zoodanig circuleert met een bijzondere affiniteit tot een bepaald orgaan, of is de vondst de uitdrukking van de aanpassing aan dat orgaan?

Op de vraag van Dr. Tasman antwoordt spreker nog, dat de fixaten van den pneumococcus inderdaad als verschillende reactievormen van een zelfden genotypus zijn te beschouwen. Deze reactie-vormen zijn door verschillende polysacchariden chemisch bepaald.

Prof. Westerdijk zegt, dat de phytopathologen hopen nog eens met de medici overeenkomst te treffen wat de nomenclatuur aangaat, vele verkeerde, ongedefinieerde begrippen bestaan er nog in de phytopathologie. Zoo het woord „staling” wat eigenlijk de atrophie en degeneratie van spreker samenvat. Zij vraagt nog of degeneraties wel positieve eigenschappen kunnen laten zien en meent, dat deze meest atavismen zijn.

Spreker dankt Prof. Westerdijk voor haar opmerking; het zou zeker van groot belang zijn, indien de ervaringen van de bijzondere gebieden uit één gezichtspunt konden worden beschouwd. Ook bij de schimmels heeft men, evenals bij bacteriën, met allerlei reacties op kunstmatige media te doen, die ten slotte blijvend regressief kunnen zijn.

Wat het begrip degeneratie betreft — spreker sprak hier

vroeger uitvoeriger over — hieronder zou kunnen worden verstaan, in overeenstemming met de terminologie bij hogere organismen een physiologische evenwichtsverstoring (hormonaal b.v.) tijdens de individuele existentie, die leidt tot het aan den dag komen van phylogenetisch oudere toestanden (Bolk). Beyerinck wees er reeds op, dat alle zoogenaamde plus-mutanten atavismen zijn. Spreker noemt als voorbeelden: de ammoniak-positieve en de indolvormende klonen van den typhusbacil, het haemolytisch worden van pneumococcus.

Naar aanleiding van enkele andere opmerkingen, zegt spr. nog, dat veranderingen van de genotypische constitutie ook voor de bacteriën aanvaard moeten worden. Het probleem van het ontstaan van soorten moet echter in de bacteriologie met denzelfden biologischen eerbied worden benaderd als in de leer der hogere organismen. Bij de hogere organismen tast men de genotypische constitutie reeds experimenteel aan; d.i. principiëel zeer belangrijk, omdat we hier een eersten stap zien tot de wording van nieuwe soorten onder invloed van het milieu. Niemand kan zeggen wat hier voor de bacteriologie is weggelegd. Doch laat men er aan vasthouden, dat wat men dagelijks waarneemt, functioneele uitingen zijn, reacties van de klonen krachtens hun speciëele physiologische eigenschappen; in bijzondere gevallen van regressief karakter, leidend tot atropheontische en dystrophische veranderingen van den kloon.

Prof. Schüffner merkt nog het volgende op: Een concreet voorbeeld voor dat, wat de nomenclatuur van Van Loghem wil uitdrukken, levert de pestbacil in dien vorm, zooals deze door Prof. Otten als levend vaccin gebruikt wordt. Langzamerhand mag men de veranderde stam wel een atropheont noemen, doch den eersten tijd zal zijn gebruik Prof. Otten zeker wel slape-looze nachten berokkend hebben wegens de vrees, dat de stam toch maar een fixaat was.

Na de middagpauze behandelde Ir J. van Beynum (Hoorn) het onderwerp: Voeder-ensileering.

De conserveering van gras en andere groene planten in vochtigen toestand voor de wintervoeding van het vee, staat bekend onder de namen „inkuiling” en „ensileering”. Het doel, dat daarmee nagestreefd wordt, is het voeder door luchtdichte afsluiting te vrijwaren tegen bederf, waaronder in hoofd-

zaak verstaan wordt de ontleding der waardevolle eiwitten. In de silage spelen zich bacteriële processen af, die wij gunstig noemen als zij de conserveering bevorderen, ongunstig als zij bederf veroorzaken of daartoe leiden. De melkzuurgisting is dus gunstig, omdat zij een conserveerenden zuurgraad kan doen ontstaan, welke de werkzaamheid van de rottings-bacteriën onmogelijk maakt. In silages treedt ook dikwijls boterzuurgisting op. In de literatuur wordt deze beschouwd als een „verkeerde” gisting, waarvan het uitbreken bepaald zou worden door toevallige omstandigheden van temperatuur en vochtigheidsgraad.

Over de beteekenis van melkzuur- en boterzuur-gisting voor de conserveering zijn door de Bacteriologische Afdeling van het Rijkslandbouwproefstation te Hoorn onderzoekingen verricht, welke tot een andere opvatting geleid hebben.

De melkzuurgisting, die in een silage, welke niet op kunstmatige wijze met anorganische zuren geconserveerd is en welke geen broei vertoont, zeer snel begint, verzuurt het plantenmateriaal tot een zekeren zuurgraad, die afhangt van het suikergehalte van het materiaal en mede bepaald wordt door het gehalte aan bufferende bestanddeelen. Is de bereikte eindzuurgraad hoog genoeg, dan blijft de silage verder in dezen goeden (verzuurden) toestand; zij is *stabiel*. Is de bereikte zuurgraad niet hoog genoeg, dan is ontwikkeling van andere bacteriën, mogelijk. Deze boterzuurbacteriën zijn van het type *Cl. tyrobutyricum*, dat melkzuur kan vergisten. Door deze melkzuurvergistende boterzuurgisting vermindert de zuurgraad, waardoor de kans op ontwikkeling van rottingsbacteriën grooter wordt. Een dergelijke silage is na de melkzuurgisting dus *instabiel*; de zuurgraad daalt, melkzuur verdwijnt, boterzuur wordt gevormd en eiwit wordt ontleed; de silage bederft. Deze boterzuurgisting op zichzelf is bovendien een gevaar voor de kaasbereiding, daar de hierbij betrokken boterzuurbacteriën in kaas door hun gasvorming onaangename gebreken kunnen veroorzaken.

Daar van de genoemde bacteriesoorten, rottings- en boterzuurbacteriën, de laatste het minst gevoelig zijn voor zuur, zal dus een silage stabiel blijven, als door de melkzuurgisting de zuurgraad zóó hoog geworden is, dat de boterzuurbacteriën zich niet meer kunnen ontwikkelen. Wij vonden in cultuur-

proeven met reïnculturen, dat de meest zuurresistente boterzuurbacteriën stammen niet meer groeiden bij pH-waarden beneden 4.0 à 4.2. In overeenstemming hiermede bleek bij silages uit de praktijk de grens tusschen het stabiele en het instabiele gebied bij een pH van ongeveer 4.2 te liggen.

Deze theorie verklaart tevens waarom de frequentieverdeeling van silages in het pH-gebied tweetoppig is. Door boterzuurgisting en rotting zijn n.l. alle silages, welke na de melkzuurgisting niet een pH beneden ongeveer 4.2 hadden, verschoven naar het gebied van pH omstreeks 5, zoodt bij oudere silages bijna geen pH-waarden tusschen 4.2 en 4.8 voorkomen.

Om goede stabiele silages te bereiken is het dus noodzakelijk, dat de pH beneden 4.2 komt en dit wordt in de praktijk beproefd met anorganisch zuur of met suikerhoudende stoffen. Hoewel men bij het gebruik van een voldoende hoeveelheid van deze stoffen boterzuurvrije silages zou verwachten te krijgen, is dit helaas niet het geval. Het onderzoek heeft geleerd, dat door het niet volkomen homogeen mengen van voeder en toevoegsel lagen en plekken in de silage voorkomen, waardoor hier boterzuurgisting kan optreden, zij het dan in beperkte mate, omdat de zuurdiffusie uit de betere lagen dit proces kan stuiten.

Betreffende typische broeisilages werd gevonden, dat deze practisch geen melkzuur bevatten. Zij vormen een aparte groep, die in verschillende opzichten sterk afwijkt van die der melkzuurgistingssilage.

Bij de discussie vraagt Dr. Matla of de toevoeging van mineraal zuur ook nadeelig voor het vee kan zijn, waarop spr. antwoordt: Het gebruik van mineraalzuur-silage kan voor het vee van nadeel zijn, omdat het tot acidose kan leiden. Dit is vooral het geval met de silages van lage pH en bij voeding van groote hoeveelheden. Deze nadeelige gevolgen kunnen bestreden worden door toediening van krijt of bicarbonaat. Op de vraag van Dr. Matla, welk zuur in broeisilages aanwezig is, antwoordt spreker, dat dit nog onbekend is.

Mevrouw Wibaut-Isebree Moens vraagt wat men doet met den inhoud van een silo, indien de silage niet goed is. Spreker antwoordt, dat ook de slechte silages aan het vee worden opgevoerd, omdat het deze toch graag eet. Door de ontleding

van de waardevolle eiwitten, den onaangename geur (die kan overgaan op melk en boter) en het gevaar voor de kaasbereiding, is het evenwel van groot belang, dat er alleen silages van goede kwaliteit bereid worden.

Als tweede spreker in de middagvergadering behandelde E. G. Mulder (Wageningen) het onderwerp: Over de betekenis van koper voor biologische processen.

Tot de eerste onderzoeken over den invloed van koper-verbindingen op den plantengroei behooren die over de z.g. ontginningsziekte. Deze ziekte, die wordt aangetroffen op vele, pas ontgonnen zand- en veengronden, kan worden genezen met een gift van 50 kg kopersulfaat per hectare. Over de werking van het kopersulfaat bestaan verschillende meeningen. Men heeft gedacht aan het onoplosbaar maken van schadelijke stoffen, aan het vernietigen van parasitaire micro-organismen en ook aan het opheffen van een aanwezig kopergebrek. Een uitvoerig onderzoek voerde tot de conclusie, dat de twee eerste verklaringen niet juist konden zijn. Het bleek, dat de verschijnselen, die zich voordeden bij de cultuur van verschillende granen in water- en kwartszand, culturen zonder koper, identiek waren met die, welke in den zieken grond optraden.

Met behulp van een micro-biologische methode kon verder worden bewezen, dat de zieke gronden een zeer laag gehalte aan opneembaar koper hadden. Deze methode berust op het feit, dat de schimmel *Aspergillus niger* voor een normale ontwikkeling koper noodig heeft. Ontbreekt dit element in voldoende hoeveelheden, dan is de kleur der sporen niet zwart, maar grijs, bruin, of geel, al naar de hoeveelheid koper, die aanwezig is. Door nu een bepaalde hoeveelheid van den te onderzoeken grond toe te voegen aan voedingsoplossingen, te enten met een sporesuspensie en vervolgens na verloop van vier dagen de sporekleur waar te nemen, is men in staat een indruk te krijgen van het opneembare kopergehalte. Wil men deze hoeveelheid kwantitatief bepalen, dan moet men de kleur vergelijken met die van een standaardserie. Op deze manier kan men zeer kleine hoeveelheden koper bepalen. Van zestig met deze methode onderzochte zand- en veengronden, bleken de zieke gronden per gram droge grond niet meer dan 0.4 γ oplosbaar koper te bezitten, enkele zwak zieke hadden 0.6—0.8 γ

terwijl de gezonde gronden steeds boven $2\frac{1}{2}$ γ soms zelfs boven 10 γ per gram droge grond hadden.

Verder werd aangetoond, dat tarwe, gegroeid op zieken grond, een kopergehalte in het zaad had van 0.6 m.gr. per kg droge stof. Bemest met 100 kg CuSO_4 per ha was dit 2.5 mg; tarwe van kleigrond had 2.4 mg. Voor haver werden overeenkomstige cijfers gevonden.

Uit deze proeven volgt, dat de oorzaak van de ontginningsziekte te zoeken is in een te laag opneembaar kopergehalte. Bij het onoplosbaar maken van koper in den grond spelen zwarte humusverbindingen en vermoedelijk bepaalde bacteriën een rol. Aangetoond kon worden, dat H_2S -vormende bacteriën de opneembaarheid van het koper aanzienlijk verminderden.

Wat nu de physiologische functie van het koper betreft, kan worden gewezen op de beteekenis van dit element bij enkele biologische oxydatiereacties. Het is gebleken, dat behalve voor de zwartkleuring van de sporen van *Aspergillus niger*, koper ook noodig is voor de zwart-bruinkleuring van *Azotobacter chroococcum*, terwijl ook de omzetting van aethanol tot azijnzuur door *Acetobacter aceti* sporen koper vereischt.

Bij de discussie vraagt Dr. Schlemper of er metalen zijn, die de rol van het koper kunnen overnemen? Spreker antwoordt, dat er van de, tot nu toe onderzochte, metalen er geen enkele is, die koper kan vervangen. Dit geldt zoowel voor *Aspergillus* als voor de hoogere planten.

Dr. Matla vraagt, welke koperconcentratie schadelijk op haver en andere graansoorten werkt en welke de invloed is van mangaanverbindingen op *Aspergillus*? Spreker antwoordt, dat 0.3 m.gr. koper per L. op haver in watercultuur reeds schadelijk werkt. Tarwe en vooral rogge zijn gevoeliger voor koperovermaat dan gerst en haver. Het weglaten van mangaan uit de voedingsoplossing geeft een iets geringere myceliumontwikkeling van *Aspergillus*. De sporekleur wordt er niet door beïnvloed.

Prof. Westerdijk vraagt of er een speciale cultuur van *Aspergillus niger* is gebruikt en of het verkleuren der stammen in de collectie door kopergebrek ontstaat? Spreker antwoordt, dat de gebruikte *Aspergillus* een gewone stam is uit de schimmelverzameling van het Laboratorium voor Microbiologie te Wageningen en dat het verkleuren een andere oorzaak moet

hebben, daar de gewone voedingsmedia meestal voldoende koper bevatten om zwarte sporen te geven.

Prof. van Loghem vraagt of de werking van stadsvuil (Becariprodukt) op de ontginningsziekte ook aan koper is te wijten en wijst in dit verband op vroegere proeven van Prof. Hudig, die overeenkomst vond met den invloed van kopersulfaat op slechten grond. Spreker antwoordt, dat inderdaad zeer waarschijnlijk de gunstige werking van compost op ontginningszieken grond op het hooge kopergehalte berust in dit produkt aanwezig. De asch van compost heeft nl. dezelfde werking als het produkt zelf.

Ir. van Schouwenburg merkt op, dat bij de ontwikkeling aangaande onze inzichten betreffende het chemisme der ademhaling in de laatste jaren de belangrijkheid van het koper zeer op den achtergrond is gekomen. Waar de heer Mulder thans de werking van het koper aan oxydatieprocessen toeschrijft, wordt gevraagd of hij over deze processen nadere inlichtingen kan geven. Spreker antwoordt, dat uit de meege-deelde gegevens de groote beteekenis blijkt van koper voor biologische processen. Of dit element hierbij steeds de functie van oxydatie-katalysator vervult, zooals dit bij eenige biologische reacties het geval is, zal het verdere onderzoek moeten leeren.

Als laatste spreker deelde Ir. G. L. W. Wiebols (Wageningen) iets mede over: Enkele Actinomyceten en hun plagen.

Deze voordracht verschijnt in het tijdschrift.

Bij de gedachtenwisseling vraagt Dr. den Dooren de Jong of de actinomycetenphaag wel eens op mycob. tuberc. geprobeerd is of op apathogene mycobacteriën? Spreker antwoordt, dat de, door hem geïsoleerde, phagen niet werken op mycob. tuberc. en een andere niet pathogene mycobacterie. Evenmin is het hem gelukt op genoemde bacteriën tot nu toe nieuwe phagen te kweken. Er zijn geen phagen bekend, die virulent zijn op zuurvaste organismen.

Daar niemand daarna meer het woord verlangt, sluit de Voorzitter om ongeveer half vijf de vergadering, met dank aan de sprekers.

T. FOLPMERS, Secretaris.

ANTONIE VAN LEEUWENHOEK

NEDERLANDSCH TIJDSCHRIFT VOOR HYGIËNE,
MICROBIOLOGIE EN SEROLOGIE

verschijnt driemaandelijksch.

PRIJS PER JAARGANG fl. 8.50.

Men abonneere zich door den Boekhandel of bij de Uitgevers
N.V. SWETS & ZEITLINGER, Boekhandel en Uitgevers Maats-
schappij Keizersgracht 471, AMSTERDAM

Alle stukken, de redactie betreffende, zijn te richten aan Prof. Dr. W. C. DE
GRAAFF, Prins Hendriklaan 73, UTRECHT.

Den schrijvers wordt verzocht hun manuscripten geheel persklaar, zooveel
mogelijk in machineschrift geschreven, in te zenden.

Mededeelingen aangaande advertenties, verzending, adresverandering en
dgl. aan de Uitgevers.

ANTONIE VAN LEEUWENHOEK

NEDERLANDSCH TIJDSCHRIFT VOOR HYGIËNE, MICROBIOLOGIE EN SEROLOGIE

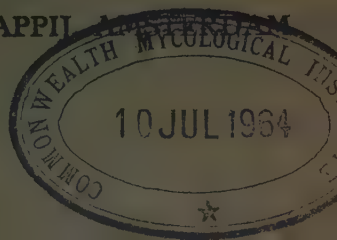
Orgaan van de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie



Onder redactie van Prof. Dr. W. C. DE GRAAFF, Hoogleeraar a. d. Rijksuniversiteit
te Utrecht en Dr. W. Aeg. TIMMERMAN, Directeur van het
Rijks Instituut voor de Volksgezondheid te Utrecht.

Vaste medewerkers: Prof. Dr. H. ALDERSHOFF (Utrecht), Prof. Dr. L. DE BLIECK
(Utrecht), Prof. Ir. B. VAN DER BURG (Wageningen), J. P. BIJL (Utrecht), Dr. W.
DOORENBOS (Alexandrië), Prof. Dr. P. C. FLU (Leiden), Dr. T. FOLMERS (Rotterdam),
Dr. J. A. VAN HASSELT (Amsterdam), Dr. J. VAN DER HOEDEN (Utrecht), Prof. G. KAPSENBERG
(Groningen), Prof. A. KLEIN (Den Haag), Prof. Dr. A. J. KLUYVER (Delft), Prof. Dr.
J. J. VAN LOGHEM (Amsterdam), Dr. P. A. MEERBURG (Bussum), Dr. S. L. SCHOUTEN
(Utrecht), Prof. Dr. W. A. P. SCHÜFFNER (Amsterdam), Prof. Dr. J. SMIT (Wageningen),
A. J. VITRINGA (Amsterdam), Prof. Dr. JOH^A WESTERDIJK (Baarn).
Prof. L. K. WOLFF (Utrecht).

N.V. SWETS EN ZEITLINGER
BOEKHANDEL EN UITGEVERSMAATSCHAPPIJ



INHOUD.

	Blz.
1. J. J. VAN LOGHEM, Over bacterie-verandering als normale en ziekelijke functie	113
2. DR. R. TH. SCHOLTENS, De smooth-roughvariatie van de Typhus-bacterie	126
3. DR. H. W. DE BOER en O. BOSGRA, Onderzoekingen betreffende de schadelijkheid van minerale olie als plaatolie	147
4. F. LIEBERT and L. KAPER, Some notes on the influence of light on coloured coli-media	164

Over bacterie-verandering als normale en ziekelijke functie ¹⁾

DOOR

J. J. VAN LOGHEM.

§ 1. Inleidende opmerkingen.

Ter inleiding van eenige mededeelingen over bacteriële veranderlijkheid veroorloof ik mij met een enkel woord aan te knopen aan een beschouwing, die ik reeds vroeger in onze vereeniging mocht ontwikkelen ²⁾.

Tot uitgangspunt van deze beschouwing diende mij het begrip soort, zooals ons dit door *Hugo de Vries, Johannsen* en andere biologen is bijgebracht. Aldus kwam ik in verzet tegen de wijze waarop dit begrip door velen in de bacteriologie wordt gehanteerd ter verklaring van de verschijnselen van bacteriële veranderlijkheid. De soort als biologische eenheid wordt ontkend, de soortgrenzen raken vervaagd, de bacteriële soort is iets onstandvastigs, de microben zouden zich van de hoogere organismen onderscheiden door de erfelijkheid van verworven eigenschappen. Dagelijks zou men kunnen waarnemen: het overgaan van bacteriën van de ééne soort in de andere en het ontstaan van nieuwe soorten.

Tegengesteld aan deze opvatting luidde mijn voorstel *de standvastigheid* van de bacteriële soort te aanvaarden. Evenals de soorten van hoogere organismen wordt de bacteriële soort dan bepaald door haar genotypische constitutie. Anders gezegd: alle individuen, die binnen ééne soort zijn te vereenigen, bezitten een zelfden, erfelijk standvastigen, aanleg van eigenschappen. Ook van nieuwe bacterie-soorten berust dan het ontstaan op een

¹⁾ Voordracht gehouden in de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie, 22 Mei 1937.

²⁾ Nederl. Tijdschrift voor Hygiëne, Microbiologie en Serologie, Deel IV, blz. 32, 1930 en Deel VIII, blz. 27, 1933.

wijziging van de genotypische constitutie: mutatie in den zin van *de Vries* is voor bacteriën evenzeer denkbaar en aanvaardbaar als voor hogere organismen

Rechtstreeks is bij bacteriën het ontstaan van mutanten niet te bewijzen. De abstractie *genotypische constitutie* verliest daarmee echter niet haar zin. Zij is even onaantastbaar als het begrip bacterie-soort.

Dat niet alle bacteriesoorten even oud zijn, dat er dus wijzigingen van genotypische constituties, d.w.z. mutaties, zijn gebeurd, staat intusschen vast. De commensale en parasitaire bacteriën, die in symbiose met den mensch leven, zullen als soort allicht niet veel in leeftijd met hun gastheer-soort verschillen. Aldus is het niet overmoedig aan te nemen dat de typhus-bacil later op aarde is verschenen dan b.v. de coli-bacil of de proteus-bacil.

Van welken aard zijn dan de veranderingen naar vorm, chemische samenstelling, antigene structuur, biochemische vermogens en virulentie, die wij elken dag in het laboratorium bij bacteriën kunnen waarnemen; veranderingen deels van snel voorbijgaanden aard, deels van langen duur, deels volstrekt bestendig? Het beginselloos gebruik maken van termen als variant, mutant, phase, type en ras draagt er niet toe bij van dezen aard een helder denkbeeld te vormen.

De voorstelling, die ik van de bacteriële veranderlijkheid heb gegeven, en waarbij ik mij als grondslag de onveranderlijkheid van de soort aanvaardde, brengt de alledaagsche verschijnselen van veranderlijkheid tot *de verrichtingen van het bacterie-individu* en rekent aldus de studie der bacterieveranderingen tot de physiologie³⁾.

Zooals ik vroeger heb toegelicht is het daartoe noodig niet de enkele cel als individu te beschouwen, doch den kloon, d.w.z. de uit ééne cel voortgekomen nakomelingschap.

Men geve zich er rekenschap van, dat bij de voortplanting van een ééncellig ongeslachtelijk wezen de nieuwe cellen somatisch de voortzetting zijn van de moedercel; de groeiende kloon

³⁾ Veranderingen van bacteriën, in verband met het individuele in den bacterie-kloon beschouwd. Ned. Tijdschr. v. Geneesk., 1921, nr. 5; over het zelfde onderwerp: Centralbl. f. Bakt. I, Orig. Deel 88, 1922; Ned. Tijdschr. v. Geneesk. 1929, nr. 6; Zeitschr. f. Hyg., 1929, Deel 110; Kon. Akad. v. Wet. Proc. Vol. 34, 1931; Annales de l'Institut Pasteur, juin 1937.

vertegenwoordigt de individueele existentie en is aldus de drager van de individueele verrichtingen.

In den kloon liggen dus tezamen besloten:

- 1° de erfelijkheid van de genotypische constitutie;
- 2° de denkbare veranderlijkheid van den genotypus (mutabiliteit);
- 3° de phaenotypus, d.i. de reactie van den genotypischen aanleg op het milieu;
- 4° het complex der individueele verrichtingen, d.w.z. de reactie van het individu op prikkels uit de buitenwereld.

Uit dit laatste volgt dat de veranderingen van den kloon in hoofdzaak de verrichting van zich aan te passen openbaren.

Ter toelichting een voorbeeld.

Gaan wij uit van een coli-bacterie, die gelegenheid vindt zich te vermeerderen in geschikte middenstoffen en aldus een aantal eigenschappen ontvouwt, die in hun totaliteit de soort kenmerken. Nu brengen wij cellen van den voortgegroeiden kloon in een minder geschikt milieu, waarbij de eigenschappen bij verderen groei zich wijzigen: de bewegelijkheid verdwijnt, de lactaseproductie houdt op, de op vaste voedingsbodems zich vormende kolonies zijn „ruw” in plaats van „glad”.

Is dit een blijvende wijziging, een verandering van den genotypus, een mutant? Volstrekt niet. Teruggebracht in geschikte middenstoffen herneemt de kloon de eigenschappen, die hem aanvankelijk kenmerkten. Wat wij waarnamen was een *adaptaat*.

Het aldus tijdelijk „intrekken” van eenige eigenschappen, deze tijdelijke verandering van den coli-kloon, beschouw ik als in wezen overeen te komen met individueele reactieve verrichtingen bij hogere organismen: b.v. secretievermeerdering, gewijzigde bloedverdeeling, iriscontractie, enz., enz.

Nu is het opmerkelijk dat een gegeven aanpassingstoestand zeer lang bewaard kan blijven, ook na terugkeer in het oorspronkelijke milieu. Men spreekt dan van mutant, type, ras, impressed variety, Dauermodifikation.

Deze termen zijn echter niet van pas. De genotypus blijft onveranderd, dus van mutant, type of ras is geen sprake. Evenmin is er modificatie of variatie. Slechts is de adaptatietoestand tijdelijk bestendig.

Tot aanduiding hiervan is het woord *fixatie* bruikbaar.

Onder fixatie stel ik voor te verstaan een adaptatietoestand, die langen tijd ook in nieuw milieu behouden blijft.

De „typen” van den pneumococcus zijn dus *fixaten*. Aanvankelijk mocht men wel geneigd zijn aan ondersoorten te denken, d.w.z. aan verschillen in genotypische constitutie. Sinds het werk van *Griffith, Neufeld* en anderen weten wij beter; een pneumococcus van een of ander zoogenaamd type kan men naar willekeur, zij het dan met eenige moeite, uit zijn gefixeerden toestand losmaken en tot een nieuwen adaptatietoestand dwingen.

Dit langdurig beklijven van een adaptatietoestand kennen wij ook bij hogere organismen. Actief verworven immuniteit b.v., is adaptatie. Een mensch, die na pokken te hebben door-gemaakt, zijn leven lang tegen het pokkenvirus immuun blijft, is van dit gezichtspunt uit bezien een fixaat. Het lang blijvend aangepast zijn is een algemeen physiologisch verschijnsel, waarvan de kennis ons ter verklaring van bepaalde bacteriologische veranderlijke verschijnselen uitnemend kan dienen.

In deze voorstelling zijn ook de ervaringen onder te brengen omtrent ziekte en blijvende schade, die bacterie-klonen door abnormale prikkels uit de buitenwereld kunnen ondervinden. Daartoe heb ik aan de pathologische physiologie en anatomie de begrippen atrophie en mutilatie ontleend ter classificeering en benoeming van ziekelijke bacterieele veranderingen. Naast *adaptaten* en *fixaten* erkennen wij dus *atropheonten* en *mutilaten*; met deze laatsten duiden wij dan klonen aan, die blijvend in hun functie zijn geschaad of die blijvend vormbestanddeelen der normale cellen — zooals sporen, zweepdraden, kapsel — missen.

Aan de pathologische physiologie is ook het begrip degeneratie ontleend: d.i. ziekelijke storing van het physiologische evenwicht, die tot nieuwe pathologische functies kan leiden (*dystrophie*) en waarbij phylogenetisch oudere kenmerken voor den dag kunnen komen (*atavisme*); *Beyerinck* heeft hier het eerste op gewezen.

In het aan het einde van deze voordracht geplaatste overzicht, dat met den term fixaat werd aangevuld, is het bovenstaande samengevat ⁴⁾.

⁴⁾ Ik reproduceer dit opnieuw omdat mijn voorstelling door verscheidene auteurs onvolledig of zelfs geheel onjuist is weergegeven.

Flu schrijft in zijn „Voordrachten over aetiologie, epidemiologie en

§ 2. Veranderende klonen van *Proteus vulgaris*.

Sinds vele jaren reeds onderzoeken wij de veranderlijkheid van *Proteus vulgaris*. Het „mozaiek” der antigene compositie van *Proteus vulgaris* kwam reeds bij de eerste ervaringen met *Proteus anindologenes* aan den dag. Men vindt het bij *K. P. Groot*⁵⁾ en in het bijzonder bij *H. Boelman*⁶⁾, die de absorptiemethode toepaste, nader onderzocht. *Boelman* toonde ook reeds de veranderlijkheid van het mozaiek aan.

Eenige jaren geleden hebben wij in het bijzonder het mozaiek van het O-antigeen van *Proteus indologenes* en *anindologenes* nader trachten te ontleden. In het Genootschap ter Bevordering van Natuur- Genees- en Heelkunde te Amsterdam (Microbiologenavond op 6 Mei 1936) werd, mede namens *Mevrouw H. E. Casparé*, hierover reeds een mededeeling gedaan.

Aanleiding juist op het O-antigeen van de beide *Proteus*-

speciële prophylaxis van de infectie- en parasitaire ziekten van den Mensch” (Haarlem, Erven Bohn 1936) blz. 83: „Bij bacteriën kan men niet „zonder meer het begrip „mutatie”, zooals het door *de Vries* gedefinieerd „werd overdragen De vegetatieve cel is bij bacteriën tevens de „geslachtscel en hierom spreekt men ook bij bacteriën van mutatie, hoewel „zij zich ongeslachtelijk voortplanten en men dus niet constateeren kan of „de „mutant” kiemvast is. *Van Loghem* heeft voorgesteld van „mutulanten” „te spreken”.

Het woord „mutulant” — het klinkt als een diminutivum van mutant — is door mij echter nooit gebruikt en, voorzoover ik weet, evenmin door iemand anders.

Wel heb ik naar hun vorm blijvend regressief veranderde klonen den term *mutilaat* (verminkt) voorgesteld, zoodat *Flu* zich misschien verschreven heeft. Intusschen is mutilatie slechts één enkele term van de door mij gegeven terminologie der bacterieele veranderlijkheid.

Elkeles in zijn monographie over *Paratyphus* (*Weichardts* Ergebnisse, Deel XI, 1930, blz. 160) heeft „Biëgsamkeit der genotypischen Anlage (*van Loghem*)” aanvaard en gebruikt dan dit begrip ter verklaring van de variabiliteit der *paratyphusbacillen*. Nu is een „Biëgsamkeit der genotypischen Anlage” volstrekt in strijd met het begrip genotypus en het is dan ook mijn bedoeling geweest uiteen te zetten dat een juist inzicht in de bacterieele veranderlijkheid slechts te verkrijgen is, indien men de Biëgsamkeit der genotypischen Anlage, naar het voorbeeld van *Johannsen* ten aanzien van de hogere organismen, ook voor de bacteriën *verwerpt*. Mijn uiteenzetting is dus door *Elkeles* geheel misverstaan.

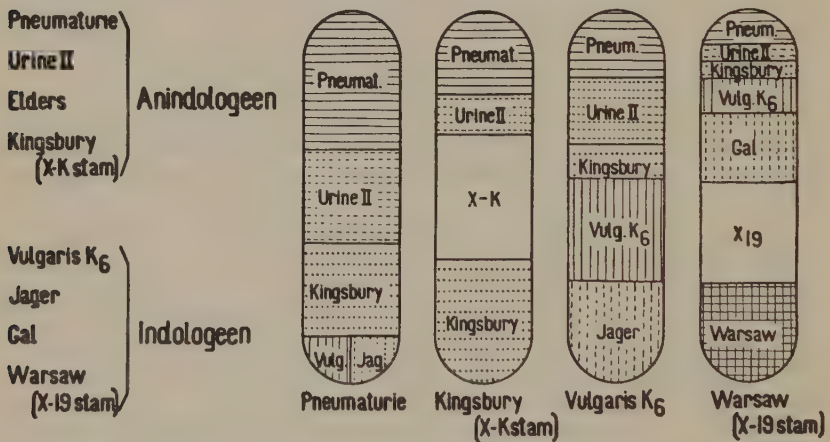
⁵⁾ Bijdrage tot de rangschikking der zoogenaamde *Proteusbacillen*, Acad. Proefschrift, Amsterdam, 1917.

⁶⁾ Vergelijkend onderzoek van indologene en anindologene *Proteus*-stammen, Acad. Proefschrift, Amsterdam, 1923.

vormen terug te komen bestond in het feit, dat ook de X-stammen, die met vlektyphussera een agglutinatie van O-karakter vertoonen, zich als indolvormend en niet-indolvormend onderscheiden. *Proteus X₁₉* (vlektyphus enz.) is indologeen, *Proteus-X-Kingsbury* (mijtekoorts, scrubtyphus) is anindologeen.

Ops op de samenstelling van het O-antigeen gericht onderzoek werd dus ingesteld met indologene en anindologene, gewone (= niet-X) en X-stammen. Tegenover sera, bereid met op carbolagar van hun H-antigeen (zweepdraden) beroofde bacillen, dienden alcoholische suspensies volgens *Bien*.

Dit systematische onderzoek bracht gewone stammen en X-stammen binnen één gezichtsveld. Het leerde, dat in gewone stammen en X-stammen dezelfde indologene en anindologene componenten aanwezig zijn, met eenige karakteristieke schifting in indologene en anindologene richting. Een samenvatting van de gegevens is in onderstaande figuur I voorgesteld.



Figuur I. Onderling gemeenschappelijke „O”-componenten van eenige anindologene en indologene, gewone en X-stammen van *Proteus vulgaris*. De schemata zijn afgeleid uit agglutinatie-proeven met tegen „carbol”-bacillen bereide sera en alcoholische suspensies.

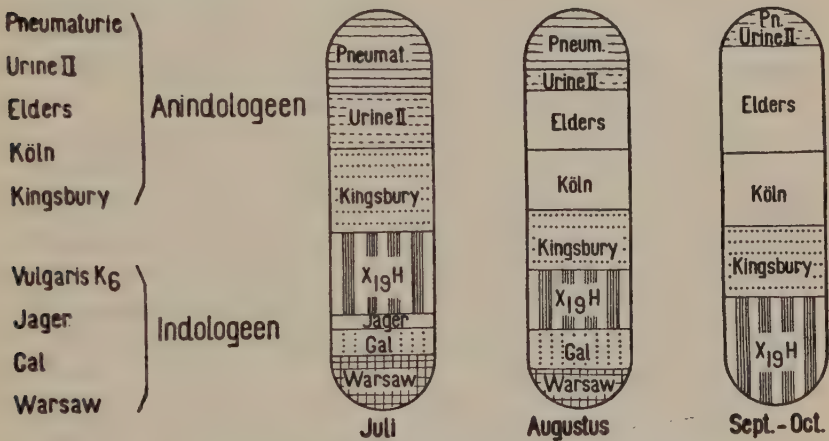
Door eenige gelukkige vondsten in ons materiaal hadden wij ook gelegenheid de veranderlijkheid van het O-antigeen van *Proteus vulgaris* nader te leren kennen.

Allereerst vonden wij een X-Kingsbury stam in statu nascendi: anindologene splitselingen van een gewonen (niet-X) indologen *Proteus* stam, jaren geleden te Amsterdam uit

kinderfaeces gekweekt, bleken door scrubtyphusserum tot den titer grens te worden geagglutineerd ⁷⁾.

Als tegenhanger vermeld ik daarbij een *Proteus*-X₁₉-stam, die bezig was zijn X-element te verliezen. Bij laatstgenoemden stam was het mogelijk de indologene componenten te zien verdwijnen en plaats maken voor anindologene componenten („Elders” en „Köln”, zie figuur II) die te voren niet aantoonbaar waren: een karakteristieke verandering dus van het „0”-mozaiek.

In figuur II is de verandering der antigene O-compositie van stam X₁₉ gedurende vier achtereenvolgende maanden schematisch weergegeven.



Figuur II. Veranderende „O”-compositie van een X₁₉-H-stam, afgeleid uit agglutinatieprouven met tegen „carbol”-bacillen van den betreffenden stam bereide sera en alcoholische suspensies van eenige anindologene en indologene, gewone en X-stammen van *Proteus vulgaris*.

Wij mogen dus als werkhypothese aanvaarden, dat van iederen *Proteus vulgaris* de genotypische constitutie tal van O-antigene componenten bevat, die zich biochemisch als indologeen en anindologeen laten onderscheiden; tot deze O-componenten behooren ook de X-factoren. In den phaenotypus blijven deze componenten meer of minder latent. Waarom vlektyphussera tegenstoffen tegen deze X-factoren bevatten, blijft onverklaard. De eenvoudigste onderstelling is, dat *Rickettsia*'s toevalligerwijze haptenen bezitten, die identiek zijn met haptenen,

⁷⁾ Voor bijzonderheden zie Ned. Tijdschr. v. Geneesk., 1936, blz. 817 en Acta Brevia, 1936, VI, 1-2.

welke *Proteus vulgaris* krachtens zijn aanleg eveneens kan vormen.

Thans wil ik nog iets meedeelen over ons jongste onderzoek over de veranderlijkheid van *Proteus vulgaris*, en daarbij aanknoopen aan een opmerking van *Kluyver* in zijn rede voor onze vereeniging op 23 Mei 1936⁸⁾.

In zijn belangwekkende beschouwing over de toekomst van de microbenwereld sprak *Kluyver* de verwachting uit, dat deze wereld ook herhaaldelijk verrijkt wordt met vormen, die door mij als atropheont worden aangeduid.

Op het eerste gehoor klinkt dit niet zeer waarschijnlijk. Bij onze voorstelling van het biologische evenwicht in de levende natuur past het zich staande houden van ziekelijk veranderde klonen minder goed. Eveneens moeten wij voor oogen houden dat de beoordeeling of iets waarlijk een atropheont is (verlies van eigenschap) of een fixaat (lang op den voorgrond blijven van een bepaalde eigenschap, tegenover latentie van andere eigenschappen) zeer moeilijk is. Zou de zoutbacterie van *Mej. Hof*, naar aanleiding welke *Prof. Kluyver* zijn opmerking maakte, niet eer als een fixaat dan als een atropheont zijn te kenmerken?

Daartegenover staat dat wij voorbeelden kennen van blijvend regressief veranderde klonen, die zich een plaats in de natuur verworven hebben.

Alastrim, pokken van zwakke virulentie en het vaccinia-virus zijn zeker het eenvoudigste als atropheonten op te vatten.

Er was aanleiding voor ons ook het vraagstuk van de vrij levende atropheonten bij *Proteus* na te gaan. Jaren geleden beschreef ik *Proteus anindologenes* — die zich van *Proteus vulgaris* onderscheidt door het onvermogen indol te vormen en ook in fermentatieve eigenschappen achterstaat — als een op zichzelf staande soort.

Ik ben hierop teruggekomen, nadat als zeer waarschijnlijk mocht worden aangenomen, dat de uit de vlektyphus-literatuur bekende anindologene X-Kingsbury een splitseling is van den indologen *Proteus-X₁₀*. *Mej. arts E. Niessen* heeft daarop nagegaan of ook gewone (niet-X) stammen wel eens anindologene klonen voortbrengen. En inderdaad heeft het haar niet veel moeite gekost eenige indologene *Proteus*stammen te vinden, uit welke anindologene klonen zijn af te splitsen.

⁸⁾ *Leeuwenhoek*, 1936, Deel III, blz. 110.

Deze anindologene klonen zijn tot nog toe even standvastig in negatieve kenmerken gebleven, als de in de natuur door ons gevonden anindologenes-stammen, van welke er sommige tientallen van jaren (onze eerste stam (Pneumaturie) is van het jaar 1905) in het laboratorium worden voortgekweekt. Er is dus reden te onderstellen dat de in de natuur voorkomende *Proteus anindologenes* atropheonten zijn van *Proteus indologenes*: d.w.z. bacteriën, door ons — zooals *Kluyver* het uitdrukte — als nieuwe gaven te verwelkomen.

Toch is één ding hierbij op te merken. In de vrije natuur heb ik *Proteus anindologenes* zelden ontmoet; vaker in het darmkanaal van dier en mensch, in het bijzonder bij kunstmatig gevoede zuigelingen⁹⁾.

Zoo krijgt men den indruk, dat de atrophie toch gepaard gaat met een vermindering van het vermogen zich in de vrije natuur staande te houden.

§ 3. Asporogene klonen van *B. anthracis*.

Eenzelfde ervaring spreekt nog duidelijker bij een andere regressieve verandering, die in de laatste jaren door den arts *J. H. Bekker* in mijn laboratorium is bestudeerd.

Pasteur vond dat *B. anthracis*, gegroeid bij 42 à 43° C., het vermogen van sporen te vormen tijdelijk verliest. Ook de virulentie vermindert dan, hetgeen *Pasteur* diende tot het bereiden van een vaccine tegen miltvuur.

Reeds vaak had ik wel eens beproefd klonen te verkrijgen, die blijvend asporogeen zijn; werkelijke atropheonten (mutilaten). Doch terloops gedaan viel dit werk niet mee. Tenslotte hernamen de enkele asporogene klonen, die ik kweekte, hun sporenvormend vermogen.

Bekker heeft drie jaren geleden dit onderzoek op eenigszins ruime schaal ondernomen en is uitgegaan van 11 stammen; deze stammen zijn 5 maal bij 80° C gepasteuriseerd, zoodat hij zeker van sporen is uitgegaan.

Hij heeft deze 11 stammen bij 42° C gekweekt, 100 dagen lang elken dag op bouillonager overgeënt en elke 5e passage gecontroleerd. Van elken stam kreeg hij aldus 20 afgeleide klonen, tezamen 220 klonen.

⁹⁾ *Bacterium (Proteus) anindologenes* bei gesunden und kranken Säuglingen, Centralbl. f. Bakt. Orig. I, deel 82, 1919.

Van deze 220 waren er bij mikroskopische en pasteurisatie-contrôle 186 asporogeen; het ontstaan varieerde tusschen de 2e en 20ste passage bij 42° C.

Teruggeslagen waren er na 1 contrôlepassage bij 37° C,

dus binnen 1 week 53 stammen 53

Na langeren tijd sloegen er terug 50

Afgestorven zijn er 75

De asporogenie werd dus verloren bij 178

Acht stammen zijn op dit oogenblik nog asporogeen, afkomstig uit 1934 en 1935.

Een drietal van deze stammen zijn virulent en tien maal door witte muizen gepasseerd zonder hun sporenvormend vermogen te verliezen.

Uit deze gegevens blijken twee dingen:

1° Mutilaten, in den zin van blijvend asporogene klonen van *B. anthracis* zijn zeer moeilijk te verkrijgen. De 45ste passage bij 42° C van stam „Wagen”, een asporogene kloon, die in den loop van 2½ jaar (Augustus 1934—Januari 1937) 51 maal de contrôlepassage bij 37° C heeft ondergaan, is ten slotte nog spore-vormend geworden. Wat een mutilaat scheen, bleek bij voortgezet onderzoek een fixaat.

2° De mutilaten of asporogene fixaten houden zich in het geheel niet gemakkelijk staande in de vrije natuur. Het is dus wel zeer onwaarschijnlijk, dat de microbenwereld met regressief veranderde miltvuurbacillen zal worden verrijkt.

§ 4. Het begrip *Phaenotypus* van bacteriologisch gezichtspunt onderzocht.

De aanvaarding van de abstractie genotypische constitutie als grondslag van het begrip standvastigheid der bacterieele soort brengt van zelve met zich de vraag hoe men den bacteriëelen phaenotypus zal omschrijven.

Aan *Johannsen* danken wij de principieele tegenstelling tusschen soortelijken genotypischen aanleg en individueele verschijning. De phaenotypus is een realiteit. Wat was aangelegd heeft zich ontwikkeld onder invloed van het milieu. Het resultaat van deze ontwikkeling is de phaenotypus.

Voor *Johannsen* was deze tegenstelling van het grootste belang: twee genotypisch verschillende wezens kunnen phaeno-

typisch gelijk zijn; twee phaenotypisch verschillende wezens kunnen genotypisch gelijk zijn.

Dit inzicht behoeft *Johannsen* voor zijn kritiek op *Galton's* opvatting, dat men door selectie van plus- of minusvarianten den typus van een nakomelingschap in positieve of negatieve richting zou kunnen verschuiven.

Inderdaad, selectie van phaenotypisch verschillende individuen leidt tot niets, indien het materiaal genotypisch homogeen is.

Het principieele verschil tusschen genotypus en phaenotypus heeft *Johannsen* dus wel scherp aangegeven. In de volledige omschrijving van het begrip phaenotypus is hij echter niet aanstonds geslaagd.

Aanvankelijk verstond *Johannsen* onder Phaenotypus een gemiddelde; zooals hij zelf zegt: een centrum, waaromheen de individuen zich groepeeren.

Een groep individuen, die genotypisch identisch zijn, vertoont dan ook in een bepaald milieu een eigen phaenotypus.

„Für jede Lebenslage ein besonderer Phaenotypus” (2e druk, pag. 275).

In den derden druk van zijn *Elemente der exakten Erblichkeitslehre* heeft hij moeten erkennen, dat de phaenotypus volstrekt individueel is: het resultaat van een individueele ontwikkeling van een bepaalden aanleg onder toevallige voorwaarden.

Hij maakt dan ook geen bezwaar het woord phaenotypus zonder meer te gebruiken ter aanduiding van de „persönliche Beschaffenheit irgendeines Individuums”.

„Für jede Lebenslage ein besonderer Phaenotypus” handhaaft hij dan ook niet; in den derden druk (p. 317) schijft hij: „Für jede Lebenslage ein besonderer *durchschnittlicher* Phaenotypus”.

Wanneer wij ons afvragen op welke wijze het begrip Phaenotypus in de bacteriologie is toe te passen, stuiten wij nog op een onzekerheid in de definitie.

Wat is „persönliche Beschaffenheit?”

Is de phaenotypus van een kruidje-roer-mij-niet veranderd als een mechanische prikkel de blaadjes doet slap hangen; is de phaenotypus van een hond veranderd, als hij op volwassen leeftijd immuun is tegen hondenziekte na het doormaken van deze besmetting in de jeugd; is de phaenotypus van een mensch

veranderd als hij van een donkere, zeer warme kamer is getreden in zeer koude buitenlucht en volle zonneschijn, zoodat zijn huidskleur en de wijidte van zijn pupillen zijn gewijzigd?

Het is duidelijk dat al deze aanpassingen mede tot den phaenotypus behooren. Wij kunnen zelfs zeggen, dat de „persönliche Beschaffenheit” eerst omschreven kan worden, indien wij de aanpassingstoestanden van het individu aan mogelijke voorwaarden van het milieu ten volle overzien.

Aldus begrepen is de phaenotypus van een individu de totaliteit van zijn adaptaties.

Wij erkennen dan tevens, dat deze omschrijving van den phaenotypus ook voor den bacterioloog bruikbaar is.

Het kennen van het persoonlijke voorkomen en wezen van een bacterie geschiedt meer nog dan bij hoogere wezens uit een opzettelijke en proefondervindelijke studie van zijn adaptaties.

Aankweeking, zuivere kweek, groei in gesuikerde media, vorming van kolonies, groeibelemmering in eigen stofwisselingsproducten — dit alles vertegenwoordigt tezamen een reeks van extreme en onnatuurlijke groeivoorwaarden, aan welke de bacterie door ons gedwongen wordt zich tot het uiterste aan te passen.

Onze voorstelling omtrent den phaenotypus van de bacterie bouwen wij dan ook op uit de experimenteele studie van deze aanpassingen.

Wat wij reeds zagen aangeduid bij de hoogere organismen, geldt zeker ten volle voor de bacteriën. *De phaenotypus van een bacterie is de totaliteit van zijn adaptaten.*

§ 5. Slotopmerking.

Belangstelling in genetische vraagstukken is op zich zelve voldoende drijfveer te streven naar een bevredigend inzicht in de verschijnselen van bacteriële veranderlijkheid.

De overtuiging kan zich daarbij voegen, dat gefundeerde begrippen omtrent bacteriële soortelijkheid en veranderlijkheid onmisbaar zijn voor de epidemiologie.

Het is opmerkelijk hoe de door *Koch* op de kennis van parasitaire microben en van hun parasitaire betrekkingen gegrondveste epidemiologie heden ten dage ondermijnd wordt door de verwarde voorstellingen, die de bacteriologen zelveu zich over

bacterieele veranderlijkheid vormen. Microbiologisch niet-geschoolde epidemiologen maken n.l. van deze verwarring gebruik om zich te voorzien van wat in de kraam hunner stoutmoedige deducties te pas komt.

Ook in het belang der epidemiologie durf ik dus een physiologische beschouwing van de veranderlijksverschijnselen bij bacteriën aanbevelen.

§ 6. *Overzicht der Bacterieele Veranderlijkheid.*

- I *Mutaties*: veranderingen van de genotypische constitutie: *Mutant*
- II *Physiologische en pathologische veranderingen* gedurende het individueele bestaan van den groeienden kloon.

Adaptatieve veranderingen, als physiologische reacties van het bacterie-individu op normale prikkels uit de buitenwereld, zich uitend in veranderingen van vorm, biochemische eigenschappen, virulentie, antigene structuur:

Adaptaat

De Phaenotypus van een bacterie is de totaliteit van zijn adaptaten.

Een adaptatietoestand kan langen tijd bestendig blijven (fixatie):

Fixaat

Regressieve veranderingen van blijvenden aard, als pathologische reactie op schadelijke prikkel uit de buitenwereld;

atrophie, blijvende vermindering of verlies van functie:

Atropheont
(*Mutilaat*)

blijvende beschadiging van vorm:
degeneratie, pathologische (nieuwe) functie:

Degenerant

(dystrophie, atavisme)

De smooth-roughvariatie van de Typhusbacterie ¹⁾

DOOR

Dr. R. TH. SCHOLTENS.

(Rijks-Instituut voor de Volksgezondheid, Dir. W. Aeg. Timmerman.)

De smooth-roughvariatie werd gevonden door Arkwright. Deze ontdekte, dat de bacteriën van de groep der pathogene darmbacteriën in twee vormen voorkomen.

De eene vorm had kolonies met een glad oppervlakte en een gave rand, en was stabiel in zoutsolutie. Hij noemde dezen vorm den smoothvorm. De andere vorm had kolonies met een ruw oppervlakte en een onregelmatigen rand, die bovendien platter en grooter waren, en was auto-agglutinabel. Hij noemde dezen vorm naar het ruwe oppervlakte der kolonies den roughvorm.

Deze cultureele of uiterlijke eigenschappen waren daarom zoo belangrijk, omdat een verschil in virulentie er mee gepaard ging. De smoothvorm bleek virulent te zijn, de roughvorm avirulent.

Een ander immunologisch verschil werd kort daarop gevonden. Door proeven met Aertrycke bacillen bewees Arkwright, dat de smoothvorm vaccins leverde, die een beschuttende werking uitoefenden tegen infecties met Aertrycke bacillen, terwijl vaccins vervaardigd met de roughvorm deze beschermende werking misten.

Men ging nu zoeken naar een verschil in antigeenstructuur. Bruce White (1925) toonde aan, dat er een verschil bestaat in antigeenstructuur tusschen smoothvorm en roughvorm.

De roughvorm bezit de thermostabiele antigenen, die de smoothvorm bezit, niet. Er bestaat een kwalitatief verschil in thermostabiel antigeen tusschen de twee vormen.

¹⁾ Voordracht gehouden op de vergadering te Baarn van de Nederl. Ver. voor Microbiologie op 22 Mei 1937.

Men neemt aan, dat de immunologische verschillen hun oorzaak vinden in de serologische verschillen.

De thermostabiele antigenen zouden een belangrijke rol spelen bij de actieve immunisatie. De roughvorm immuniseert niet, omdat hij deze antigenen mist.

Bovendien zijn zij aanwezig in de virulente smoothvormen, en afwezig in den avirulenten roughvorm. Men schrijft hun daarom ook een rol toe bij de virulentie.

Men moet het geheel van al deze veranderingen, cultureele of uiterlijke, immunologische en serologische, als smooth-rough-variatie beschouwen.

Het criterium echter, volgens welk men tegenwoordig een bepaalde stam een smoothvorm noemt, is niet meer hetzelfde als men pas na de ontdekking van de smooth-roughvariatie gebruikte, toen men afging op kolonievorm en autoagglutinabiliteit.

De virulentie is van alle smootheigenschappen wel de belangrijkste.

Felix (1936) drukt zich als volgt uit:

Als we ons beperken tot de groep der Gramnegatieve pathogene darmbacteriën, bij welke de criteria der smooth-roughvariatie het eerst werden vastgelegd, is het juist te zeggen, dat volgens de algemeen aangenomen meening smooth-zijn virulentie aanduidt en roughzijn avirulentie.

De virulentie is natuurlijk als criterium voor elken stam apart ongeschikt, daar ze zoo moeilijk te bepalen is.

Zij hangt echter samen met de antigeenstructuur.

Bevat een stam de thermostabiele antigenen, waarvan men aanneemt, dat ze een rol spelen bij de virulentie, dan is het een smoothvorm. Bevat hij deze antigenen niet, dan is het een roughvorm.

De smooth-roughvariatie is een serologisch begrip geworden.

Een stam, die het antigeen, dat men kenmerkend acht voor den smoothvorm niet bezit, kan evenwel een typische smooth-kolonievorm hebben, en stabiel in zoutsolutie zijn.

Een dergelijke stam is dus, „wat antigeen betreft rough, maar wat uiterlijke eigenschappen betreft smooth.”

Ook de Typhusbacterie bezit verschillende antigenen. Oorspronkelijk kende men één thermostabiel antigeen, het O-anti-

geen, en een thermolabiel antigeen, het H-antigeen. Dit laatste localiseert men in de flagellen, daar Ty-bacillen, die onbeweeglijk zijn en geen flagellen bezitten, dit antigeen ook niet bezitten. Het O-antigeen localiseert men daarentegen in het bacteriële lichaam zelf, en noemt het daarom het lichaamsantigeen.

Felix ontdekte nog een derde antigeen, het Vi-antigeen, dat eveneens in het bacteriële lichaam gelocaliseerd moet worden.

De Typhusbacterie bezit dus twee lichaamsantigenen, het O- en het Vi-antigeen.

De meeste stammen, die bij het routine-onderzoek gevonden worden, bevatten zoowel O- als Vi-antigeen. Er komen echter vier verschillende variaties, wat lichaamsantigenen betreft, voor, als volgt:

- Type I. bevat O- en Vi-antigeen.
- „ II. „ alleen O-antigeen.
- „ III. „ „ Vi-antigeen.
- „ IV. „ „ noch O-, noch Vi-antigeen.

Al deze vier vormen kunnen het H-antigeen, al dan niet, bevatten. Zij kunnen in elkaar overgaan, doordat een bepaalde vorm een antigeen verliest. Het omgekeerde, dat uit een bepaalden stam, die O- of Vi-antigeen niet bezit, zich een vorm ontwikkelt, die het betreffende antigeen wel bezit, komt bijna nooit voor.

Bij de Typhusbacterie acht men het O-antigeen kenmerkend voor den smoothvorm, daar men meent, dat een stam, die dit antigeen niet bezit, avirulent is, en een stam, die dit wel bezit, virulent.

Kauffmann, Felix e.a. noemen dus een Ty-stam, die het O-antigeen bevat, een smoothvorm, een stam, die dit niet bevat, een roughvorm.

Ook het Vi-antigeen speelt echter een rol bij de virulentie, zooals Felix heeft aangetoond.

Hij toonde aan, dat stammen, van het Type I, die O- en Vi-antigeen bevatten, virulenter zijn dan stammen, die alleen O-antigeen bevatten.

Het Vi-antigeen zou echter volgens Felix bij de virulentie een aparte rol spelen, waarop in Par. 7 nader zal worden ingegaan.

Stammen van het type III. zijn volgens hem avirulent, en dus roughvormen.

Kauffmann heeft een schema opgesteld voor de serologische variaties van de Typhusbacterie.

Hij onderscheidt:

- I. V. W.-vormenwisseling, d.i. verloren gaan van het Vi-antigeen, dus overgang van I in II en van III in IV.
- II. Smooth-roughvariatie, verloren gaan van het O-antigeen, dus overgang van I en II, in III in IV.

Ik kan de variaties van het H-antigeen buiten beschouwing laten.

Ik heb zooeven reeds gezegd, dat er divergenties zijn tusschen het roughzijn van een stam wat antigeen betreft, en de uiterlijke smootheigenschappen.

Voor al bij de Ty-bacterie komt het dikwijls voor, dat een stam geen O-antigeen bezit, maar de uiterlijke kenmerken van den smoothvorm heeft.

Het schijnt dus, dat deze uiterlijke smoothfactoren niet, of niet geheel, van het antigeen afhangen.

Uit de opvatting van Felix, e.a., die ik zooeven citeerde, volgt dus, dat om een bepaald antigeenverlies als een overgang van den smoothvorm naar den roughvorm te kenmerken, er een virulentieverlies aan moet gepaard gaan.

Men stelt niet den eisch, dat het optreden van uiterlijke roughkenmerken met dit antigeenverlies parallel loopt, daar men denkt, dat deze twee dingen niet van elkaar afhankelijk zijn.

Ik zal nu echter aantoonen, dat juist bij de Ty.-bacterie, waar men zoo groote divergenties vindt tusschen roughzijn wat antigeen betreft, en de uiterlijke smootheigenschappen er een streng parellisme bestaat tusschen antigeen-structuur en cultuurele smoothkenmerken.

Men moet dan echter niet alleen het O-antigeen in het oog houden.

Om een bepaald antigeenverlies als een smooth-rough-variatie te kenmerken, kan men bij de Ty.-bacterie niet alleen den eisch stellen, dat met dit antigeenverlies virulentieverlies

gepaard gaat, maar ook, dat met dit antigeenverlies (onder bepaalde omstandigheden) een verlies in uiterlijke smooth-eigenschappen verbonden is. In het volgende zal ik aantoonen, dat zoowel O- als Vi-antigeen aan deze eischen voldoen, en zal ik met dit nieuw gewonnen inzicht een nieuw schema opstellen voor de smooth-roughvariatie van de Typhusbacterie.

PAR. 1.

Techniek van het onderzoek op antigeenstructuur, en herkomst der onderzochte stammen.

Het onderzoek naar O- en Vi-antigeen geschiedde met de adsorptiemethode, omdat vele autoagglutinabele stammen in het onderzoek betrokken werden.

a. Onderzoek naar de aanwezigheid van het O-antigeen.

Dit geschiedde met een Gärtner-serum, dat den bekenden Ty.-stam H901 (die O- en H-antigeen bevat, maar geen Vi-) tot een titer van 1/12800 agglutineerde.

Bij 1 cc. van een verdunning van $1/100$ van dit serum werd 1 cc. van een suspensie der te zoeken stam gevoegd. Deze suspensie was bereid door 2 agarcultures in 3 cc. physiologisch zout te suspendeeren.

Dit mengsel werd 24 uur in de ijskast gezet. Hierna werd afgecentrifugeerd, en de bovenstaande vloeistof met den stam H 901 uitgetitreerd in telkens $2 \times$ sterkere verdunningen.

Wanneer het Gärtner-serum na de adsorptie met de te onderzoeken stam een sterke titerdaling vertoonde, (b.v. tot $1/800$, of $1/400$ voor den stam H 901) bevatte deze dus O-antigeen. Bleef de titer even hoog als voor de adsorptie, dan bevatte de stam geen O-antigeen.

De agglutinatiemethode schiet bij het onderzoek naar het O-antigeen te kort. Want een stam, die O- en Vi-antigeen bezit kan inagglutinelabel zijn voor Gärtner-serum. Dit is de zogenoemde O-resistentie.

b. Onderzoek naar de aanwezigheid van het Vi-antigeen.

Om hier de adsorptiemethode succesvol te kunnen toepassen, moet eerst een serum gemaakt worden, dat, behalve het Vi-antigeen, geen op typhusbacillen werkende agglutinenen bevat.

Dit werd gemaakt door uit een serum, bereid met den stam Ty-4516, die alleen Vi- en H-antigeen bevat, de H-agglutinen met den stam Ty-H 901 te adsorbeeren.

Dit serum bevatte naast H-agglutinen tot in een titer van $1/6400$ slechts een geringe, te verwaarloozen, hoeveelheid O-agglutinen (titer $1/50$).

Het werd met een zeer dikke suspensie van den stam H 901 tot $1/50$ verdund. Na een verblijf in de ijskast van op zijn minst een uur, bleek de bovenstaande vloeistof dezen stam niet meer te agglutineeren, maar wel de stam 4516 zelf, en wel tot een titer van $1/1600$.

Deze agglutinatie moet alleen aan Vi-agglutinen worden toegeschreven.

Met deze zoo verkregen bovenstaande vloeistof werd de eigenlijke adsorptieproef uitgevoerd.

Bij 1 cc. van deze vloeistof werd 1 cc. van een suspensie van den te onderzoeken stam gevoegd. Dit mengsel werd na een verblijf van 24 uur in de ijskast afgecentrifugeerd, en door uittitreeren met Ty.-4516 werd nagegaan, of de Vi-agglutinen uit het serum verdwenen waren.

Waren de Vi-agglutinen verdwenen, dan had de onderzochte stam deze geadsorbeerd, en bevatte dus het Vi-antigeen.

Waren de Vi-agglutinen nog aanwezig, dan bevatte de onderzochte stam geen Vi-antigeen.

De herkomst der onderzocht stammen was de volgende:

Ty.-stammen, die bij het routineonderzoek worden geïsoleerd bevatten meestal O- en Vi-antigeen. Van onze diagnostische afdeeling kreeg ik 50 stammen, die O- en Vi-antigeen bevatten.

Stammen, die alleen O- en geen Vi-antigeen bevatten, werden onder oude laboratoriumstammen gevonden, bovendien bezat ik nog de stammen Ty. 8 en H 901, die Dr. Felix mij, met enkele andere stammen uit zijn collectie, deed toekomen.

Stammen, die wel Vi-antigeen en geen of weinig O-antigeen bevatten, waren iets moeilijker te krijgen.

Ik bezat de stammen 6 S Ty 441 II, en Giglioli RB 1, van Dr. Felix en de stammen 4516 en RU, die op de diagnostische afdeeling werden geïsoleerd.

Drie andere stammen met deze antigeenstructuur werden

TABEL I. Voorbeeld van onderzoek van verschillende stammen op 0 en Vi antigenen door adsorptieproeven,

Te onderzoeken stammen, waarmede werd geadsorbeerd.	Serum Gä 298, uitgetitreerd met stam H 901, na adsorptie met verschillende op 0 antigeen te onderzoeken stammen.										Serum 4516 (dat na eerste adsorptie met de stam H 901 alleen nog maar Vi agglutinen bevat), na adsorptie met verschillende op Vi antigeen te onder- zoeken stammen, uitgetitreerd met stam Watson (die voor Vi agglutinen gevoelig is).						Antigeen structuur waartoe op grond werd geconcludeerd.
	Verdunningen								Verdunningen				0 O + Vi O + Vi Vi Vi Vi noch 0 noch Vi noch 0 noch Vi				
	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/100	1/400	1/800	1/1600	1/3200					
H 901	sp	sp	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+	—	O + Vi O + Vi Vi Vi Vi noch 0 noch Vi noch 0 noch Vi				
154	+++	+++	+±	—	—	—	—	—	—	—	—	—					
155	+++	+±	sp	—	—	—	—	—	—	—	—	—					
4516	+++	+++	+++	+++	+++	+++±	+++	—	—	—	—	—					
R.U.	+++	+++	+++	+++	+++	+++±	+++±	—	—	—	—	—					
6 S Ty 441 II	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++±	+++	+++	+++	±	—					
Ty 2 R 20 b	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	—					
Ty R.A.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+					
Contrôle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+					

+++ is volledige agglutinatie; — is geen agglutinatie;

++ en + geven minder volledige graden van uitvloeking aan.

Serum 4516 vertoonde na eenmalige adsorptie met een zeer dikke suspensie van H 901 geen agglutinatie meer met deze stam, bevatte dus geen aantoonbare H agglutinen meer in de verdunning 1/100. (De 0 titer van dit serum was vóór de adsorptie reeds = nul).

Het serum 3416 is in de proef in de tabel na adsorptie met de te onderzoeken stammen dus 2 x geadsorbeerd, eerst met H 901 en vervolgens met de te onderzoeken stam; in de contrôle alleen met H 901.

verkregen door stammen met O- en Vi-antigeen in bouillon te kweken, waaraan Gä-serum was toegevoegd.

Hierop zal in Par. 4 nog nader worden ingegaan.

Stammen, die noch O-antigeen, noch Vi-antigeen bevatten kreeg ik van Dr. Felix (Ty. 2 R 20b, Mrs S r2b MU, Ty. 8 Al RI.) en van Prof. Snijders in Amsterdam. (Ty A rough.)

Bovendien isoleerde ik 9 van deze stammen door het kweken van stammen, die O-antigeen bevatten, in bouillon met Gä-serum. Zie Par. 4.

In tabel I wordt het resultaat gegeven van het onderzoek naar de antigeenstructuur van enkele van deze stammen.

PAR. 2.

Onderzoek naar paralleliteit van antigeen-structuur en van uiterlijke smootheigenschappen van Typhusbacteriën.

De in Par. 1. beschreven stammen werden volgens de daar beschreven methode onderzocht op hun antigeenstructuur, en tevens werden de uiterlijke smooth- en rough-eigenschappen van deze stammen nagegaan.

Het is bekend, dat zoowel stammen, die O- en Vi-antigeen bezitten, als stammen, die alleen O-antigeen bezitten, de uiterlijke eigenschappen van den smoothvorm bezitten. Ook mijn 50 stammen, die O- en Vi-antigeen hadden, en de 9 stammen, die alleen O-antigeen bezaten, hadden een smoothkolonievorm, waren stabiel in zoutsolutie en maakten de bouillon diffuus troebel.

Het is eveneens bekend, dat Ty.-stammen, die geen O-antigeen bezitten, zich wat uiterlijke smootheigenschappen betreft, verschillend gedragen. Soms zijn zij autoagglutinelabel, en hebben een roughkolonievorm, soms zijn zij stabiel in zoutsolutie, en hebben een smoothkolonievorm.

Soms ook zijn zij niet autoagglutinelabel, maar hebben toch een roughkolonievorm.

Zoals zooeven is uiteengezet, beschouwen Felix, Kauffmann, e.a. dergelijke stammen als roughstammen, omdat zij geen O-antigeen bevatten.

Stammen zonder O-antigeen, die een smoothkolonievorm hebben, en niet autoagglutinelabel zijn, noemen zij stammen, die, „wat antigeen betreft rough zijn, maar uiterlijke smootheigenschappen bezitten.”

Ook onder de 20 stammen, die bij onderzoek geen O-antigeen bleken te bevatten, bevonden zich acht, die uiterlijke smootheigenschappen bezaten. Drie van deze waren stabiel in zoutsolutie en hadden bovendien een smoothkolonievorm. De vijf andere hadden als eenige uiterlijke smootheigenschap stabiliteit in zoutsolutie, maar hadden een roughkolonievorm.

De twaalf overige stammen bleken zoowel autoagglutinelabel te zijn, als een roughkolonievorm te hebben.

Toen deze twintig stammen volgens de in Par.1 beschreven methode op aanwezigheid van het Vi-antigeen werden onderzocht, bleek mij, dat de acht stammen, die uiterlijke smootheigenschappen (in ieder geval stabiliteit in zoutsolutie, soms een smoothkolonievorm) bezaten, alle het Vi-antigeen bevatten.

De twaalf overige stammen echter, die autoagglutinelabel waren, een typische roughkolonievorm bezaten, en vlokkig in bouillon groeiden, bevatten nòch O-, nòch Vi-antigeen.

De aanwezigheid van uiterlijke smootheigenschappen gaat in stammen, die geen O-antigeen bezitten, parallel met de aanwezigheid van het Vi-antigeen.

Bezit een stam, die geen O-antigeen bevat, het Vi-antigeen, dan is hij niet autoagglutinelabel, en heeft soms een smoothkolonievorm (soms evenwel ook een roughkolonievorm).

Bezit een stam nòch O-, nòch Vi-antigeen, dan is hij autoagglutinelabel, en heeft een roughkolonievorm.

PAR. 3.

Optreden van uiterlijke rougheigenschappen onder invloed van Vi-bacteriophagen.

Ten duidelijkste wordt het verband, dat er bestaat tusschen Vi-antigeen en uiterlijke smootheigenschappen gedemonstreerd, indien men uit stammen, die als eenig lichaamsantigeen het Vi-antigeen bezitten, vormen kweekt, die nòch Vi-, nòch O-antigeen bezitten.

Men kan dit gemakkelijk bereiken door middel van z.g. Vi-bacteriophagen.

Dit zijn Typhusbacteriophagen, die betrekking hebben tot het Vi-antigeen. Zij tasten alleen Typhusstammen aan, die het Vi-antigeen bezitten, en bovendien, wat in dezen belangrijker is, de secundaire cultures, ontstaan na de inwerking van deze bacteriophagen, bezitten het Vi-antigeen niet.

Door de auteurs, die deze Vi-bacteriophagen beschreven, werden voornamelijk de secundaire cultures bestudeerd van stammen, die O- en Vi-antigeen bevatten.

Deze bevatten alleen het O-antigeen.

Ik onderzocht alle in Par. 1 beschreven stammen op hun gevoeligheid voor Vi-bacteriophagen, en vond, zooals te verwachten was, dat al de stammen, die Vi-antigeen bevatten, gevoelig waren voor deze bacteriophagen.

De overige stammen waren ongevoelig voor deze bacteriophagen.

Het onderzoek op gevoeligheid voor de bacteriophaga geschiedde op agarbuisen. Deze werden over het geheele oppervlakte met een suspensie van den te onderzoeken stam beënt. Vervolgens werd met een oese een druppel bacteriophaga midden op deze buis gebracht. Waar deze druppel langs is gelopen, ziet men den volgende dag een uitsparing, indien de stam voor de bacteriophaga gevoelig is.

Vervolgens onderzocht ik de secundaire cultures, die na inwerking van deze bacteriophagen uit deze gevoelige stammen werden verkregen, op hun uiterlijke rough- en smoothkenmerken en op hun antigene structuur.

Dit geschiedde, door den stam te enten in twee buisjes bouillon, waarvan het eene eenige druppels Vi-bacteriophaga bevatte, het andere daarentegen niet.

Na een initiale opheldering verschijnt de secundaire cultuur.

Deze werd op agarplanten uitgezaaid, en er werd van diverse kolonies afgeënt. De zoo verkregen cultures werden serologisch onderzocht, en tevens werd nagegaan, of ze auto-agglutinabel waren.

De 50 stammen, die O- en Vi-antigeen bevatten werden door Vi-bacteriophagen overgevoerd in stammen, die alleen O-antigeen bevatten.

Deze secundaire cultures, die de bouillon diffuus troebel maakten, vertoonden bij uitzaaiing op de plaat smoothkolonies, en waren niet autoagglutinabel.

De 8 stammen, die wel Vi-antigeen, maar geen O-antigeen bevatten, werden op dezelfde wijze onderzocht.

De secundaire cultuur, die na lysis van deze stammen door de Vi-bacteriophaga verscheen, was vlokkelig gegroeid.

Bij uitzaaiing van deze secundaire cultuur op een agarplaat verschenen hoofdzakelijk roughkolonies.

Was de kolonievorm van den stam, waarvan men was uitgegaan, smooth, dan zag men op de plaat, waarop de secundaire cultuur was uitgezaaid, meest roughkolonies, waartusschen soms eenige smoothkolonies te zien waren.

Deze gaven bij afenting cultures, die ook in alle andere opzichten met de oorspronkelijke cultuur overeenkwamen. Zij bezaten het Vi-antigeen nog, waren nog gevoelig voor de Vi-bacteriophaga, en waren niet autoagglutinabel.

De roughkolonies gaven echter bij afenting cultures, die ongevoelig waren voor de Vi-bacteriophaga, autoagglutinabel, en, wat serologie betreft, het Vi-antigeen verloren hadden.

Door invloed van de Vi-bacteriophaga hadden deze stammen tegelijk met het Vi-antigeen hun smootheigenschappen verloren.

Onder invloed van andere bacteriophagen, die het Vi-antigeen niet aantasten, kregen deze stammen geen uiterlijke rough-eigenschappen.

Dit alles demonstreert nog eens het verband, dat er bestaat tusschen de aanwezigheid van uiterlijke smootheigenschappen en het Vi-antigeen.

Tabel II geeft een overzicht over het aantal onderzochte stammen van elke antigeenstructuur, en hun uiterlijke smooth-kenmerken voor en na inwerking van de Vi-bacteriophaga.

PAR. 4.

Rol van het O-antigeen bij het optreden van uiterlijke smooth-kenmerken.

Welk verband bestaat er tusschen de aanwezigheid van het O-antigeen en de uiterlijke smootheigenschappen van de Typhusbacterie?

Een verband is, dat de aanwezigheid van het O-antigeen een factor is, waarmee steeds uiterlijke smootheigenschappen gepaard gaan.

Immers, noch stammen, die het O- en Vi-antigeen bevatten, noch stammen, die alleen het O-antigeen bevatten, zijn autoagglutinabel.

Bovendien bezitten stammen met deze serologische structuur bijna altijd een typische smoothkolonievorm. Soms kunnen

TABEL II. Overzicht over het aantal onderzochte stammen van diverse antigene structuur, met de verdeling van verschillende eigenschappen over deze stammen, en over de na inwerking van Vi-bacteriophagen, uit deze stammen ontstane secundaire cultures.

Type	Aanwezige lichaamsantigenen	Aantal onderzochte stammen	Aantal stammen dat gevoelig is voor Vi-bacteriophag	Aantal stammen dat stabiel is in zoutsolutie	Aantal stammen dat auto-agglutinabel is	Aantal stammen met overwegend smooth kolonievorm	Aantal stammen met overwegend rough kolonievorm	Aanwezige lichaams-antigenen in de secundaire cultures	Aantal stammen met secundaire cultures die stabiel in zoutsolutie waren	Aantal stammen met secundaire cultures die auto-agglutinabel waren	Aantal stammen wier secundaire cultures overwegend een smooth kolonievorm hadden	Aantal stammen wier secundaire cultures overwegend een rough kolonievorm hadden
I.	0 + Vi	50	50	50	—	50	—	0 alleen (alle 50)	50	—	50	—
II.	0	9	—	9	—	9	—	—	—	—	—	—
III.	Vi	8	8	8	—	3	5	noch 0 noch Vi (alle 8)	—	8	—	8
IV.	noch 0 noch Vi	12	—	—	12	—	12	—	—	—	—	—

de kolonies van dergelijke stammen een niet geheel regelmatige rand hebben, en niet geheel glad zijn, de typische platte, grootere roughkolonie bezitten deze stammen nooit.

Het is bekend, dat door passages in bouillon, waaraan Gärs serum is toegevoegd, een Typhusstam het O-antigeen kan verliezen, door groei bij aanwezigheid van het homologe antilichaam.

Ik bestudeerde, hoe hierbij de uiterlijke smootheigenschappen veranderen.

Vijftien Typhusstammen werden in 10 cc. bouillon geënt, waaraan 0,1 cc. Gärtner serum was toegevoegd. Dit serum had een O-titer van $1/12800$, en bevatte $1/2$ % carbol als conserveermiddel. De concentratie van dit conserveermiddel was echter zeer gering in den voedingsbodem.

Na een week gestaan te hebben, werden de stammen overgeënt in versche bouillon met Gärtner serum. Na twee van deze passages werd op een agarplaat uitgezaaid en van verschillende kolonies afgeënt. De zoo verkregen cultures werden op de aanwezigheid van O- en Vi-antigeen onderzocht.

Zoo werd uit vijf van de zeven stammen, die alleen O-antigeen bevatten, een stam geïsoleerd, die dit antigeen niet meer bevatte. Deze stam was dan steeds autoagglutinel en had een roughkolonievorm.

Als een stam, die O-antigeen bezit en geen Vi-antigeen, dit verliest, wordt hij autoagglutinel, en krijgt een roughkolonievorm.

Uit de acht stammen, die O- en Vi-antigeen bezaten, werden op dezelfde wijze zesmaal stammen geïsoleerd, die geen O-antigeen bevatten. Deze hadden alle zes een roughkolonievorm.

Hiervan waren drie autoagglutinel. Zij bleken echter behalve het O-antigeen, ook het Vi-antigeen verloren te hebben.

De drie andere stammen waren niet autoagglutinel. Zij hadden het O-antigeen niet meer, maar bevatten nog steeds het Vi-antigeen.

Wanneer een stam, die O- en Vi-antigeen bezit, het O-antigeen verliest, wordt hij niet autoagglutinel, indien hij het Vi-antigeen blijft bezitten.

Verliest hij behalve het O-antigeen ook het Vi-antigeen, dan wordt hij autoagglutinel.

Belangrijk is het volgende op te merken. Er werden geen vormen gevonden of gekweekt, die noch O-antigeen, noch Vi-

antigeen bevatten, en niet autoagglutinabel waren, of geen typische roughkolonievorm hadden.

Resumeerende kan men het volgende zeggen:

Bevat een stam of O-antigeen, of Vi-antigeen, dan bezit hij uiterlijke smootheigenschappen. (Op zijn minst stabiliteit in zout-solutie, soms ook een smoothkolonievorm.)

Natuurlijk ook, indien hij beide antigenen bezit.

Er is geen enkele reden om aan te nemen, dat er factoren bestaan, die een stam uiterlijke smootheigenschappen kunnen doen bezitten, terwijl hij geen van deze beide antigenen bezit.

PAR. 5.

Redenen, waarom bij stammen, die het O- en Vi-antigeen bezitten onder invloed van de Vi-bacteriophag geen uiterlijke roughkenmerken optreden.

Zoowel O- als Vi-antigeen zijn factoren, die een stam uiterlijke smoothkenmerken geven.

Een stam, die O- en Vi-antigeen bezit, heeft dus twee factoren, waarvan ieder op zichzelf in staat is, hem uiterlijke smootheigenschappen te doen bezitten.

Met het Vi-antigeen verliest een dergelijke stam een van deze twee factoren.

De aanwezigheid van het andere antigeen, het O-antigeen, is voldoende, om hem zijn uiterlijke smootheigenschappen te doen behouden.

Een stam, die echter alleen Vi-antigeen bezit, en geen O-antigeen, verliest met het Vi-antigeen de enige factor, die hem uiterlijke smootheigenschappen doet bezitten. Deze stam wordt dus autoagglutinabel onder invloed van de Vi-bacteriophag.

PAR. 6.

Rol van het Vi-antigeen bij de virulentie.

Men beschouwt een antigeenverlies, waaraan virulentieverlies gepaard gaat, als een smooth-roughvariatie.

Het is eigenlijk verwonderlijk, dat verlies van het Vi-antigeen, waarvan men het belang voor de virulentie direct herkende, niet direct als een smooth-roughvariatie werd beschouwd.

De reden hiervan was ten eerste, dat men het verlies van

het O-antigeen reeds als smooth-roughvariatie beschouwde. En ten tweede, omdat men analoog aan een verschijnsel in vitro het Vi-antigeen bij de virulentie een rol toekende, die secundair was aan de rol van het O-antigeen.

Wanneer een stam O- en Vi-antigeen bevat, ziet men dikwijls, dat hij het O-agglutinine wel adsorbeert, maar er minder goed of in het geheel niet door wordt uitgevlokt. Men ziet dus in vitro een werking van het Vi-antigeen, die het O-antigeen tegen de inwerking van het O-antilichaam beschermt.

Felix stelt zich voor, dat ditzelfde ook in vivo plaats vindt. Het O-antigeen maakt de stam virulent, het Vi-antigeen beschermt ook in vivo de bacil tegen de inwerking van het O-antilichaam, en verhoogt daardoor de virulentie.

Stammen, die geen O-antigeen en wel Vi-antigeen bezitten, kunnen volgens hem niet virulent zijn.

Felix beschreef wel, dat een subcultuur van den stam Giglioli, die naast het Vi-antigeen slechts een geringe hoeveelheid O-antigeen bevatte, tamelijk virulent was. Hij schreef dit toe aan het kleine beetje O-antigeen, dat deze stam bevatte.

Door Pot werd de stam Ty. 4516 beschreven, die geen O-antigeen bevatte, en toch virulent was.

Deze stam werd door O-agglutininen niet geagglutineerd, en kon in verschillende adsorptieproeven geen titerdaling van de O-agglutininen veroorzaken.

Ingespoten bij drie konijnen deed hij geen enkele O-titer ontstaan boven $\frac{1}{50}$.

Deze stam was echter virulent.

250 miljoen kiemen van deze stam intraperitoneaal bij 5 muizen ingespoten, deden deze alle 5 binnen 24 uur sterven.

Het is niet mogelijk de virulentie van dezen stam aan het O-antigeen toe te schrijven.

Het is waarschijnlijk, dat het Vi-antigeen, ook zonder dat het O-antigeen aanwezig is, een stam virulent kan maken.

Dat de door Felix onderzochte stammen, die geen O-antigeen en wel Vi-antigeen bevatten, avirulent waren, zou men daaraan kunnen toeschrijven, dat deze Vi-antigeen misschien quantitatief in mindere mate bevatten.

Men moet zich de rol, die het Vi-antigeen bij de virulentie speelt, voorstellen als niet noodzakelijkerwijze afhankelijk van het O-antigeen.

Het virulentieverlies, dat met verlies van het Vi-antigeen gepaard gaat, is dus op één lijn te stellen met het virulentieverlies, dat met verlies van het O-antigeen gepaard gaat.

Dit neemt natuurlijk niet weg, dat O- en Vi-antigeen samen een stam virulenter zullen maken, dan O- of Vi-antigeen ieder op zichzelf.

PAR. 7.

Redenen, waarom ook het Vi-antigeen evenals het O-antigeen een rol speelt bij de smooth-roughvariatie.

Een bepaald antigeenverlies is een smooth-roughvariatie.

In de inleiding heb ik reeds opgemerkt, dat het in het geval van de Typhusbacterie mogelijk was, om de eisch te stellen, dat dit antigeenverlies niet alleen gepaard gaat met virulentieverlies, maar ook met het verlies van uiterlijke smootheigenschappen.

Het is overbekend, dat met het verlies van het Vi-antigeen een verlies in virulentie gepaard gaat.

In Par. 2 en 3 is aangetoond, dat met het verlies van dit antigeen ook een verlies van uiterlijke smoothkenmerken kan plaats hebben.

Het feit, dat stammen, die O- en Vi-antigeen bezitten, bij verlies van het Vi-antigeen hun uiterlijke smootheigenschappen behouden, doet hieraan natuurlijk niets af. De redenen hiervoor zijn in de vorige Par. uiteengezet.

Er is dus alle reden om de serologische variatie, waarbij het Vi-antigeen verloren gaat, een smooth-roughvariatie te noemen.

Dit bedoelt niet de rol van het O-antigeen bij deze variatie te miskennen. Ook het verlies van het O-antigeen geeft (zooals algemeen wordt aangenomen) virulentieverlies, en kan gepaard gaan met het verlies van uiterlijke smoothkenmerken.

Beide antigenen, het Vi-antigeen en het O-antigeen, spelen dus een gelijkwaardige rol bij de smooth-roughvariatie.

In de volgende Par. zal een schema worden gegeven, waarin de variatie, veroorzaakt door het verlies van het Vi-antigeen (V-W-variatie van Kauffmann) en de variatie veroorzaakt door het verlies van het O-antigeen (smooth-roughvariatie volgens Kauffmann) beide samen de smooth-roughvariatie vormen.

PAR. 8.

Nieuw schema voor de smooth-roughvariatie van de Typhusbacterie.

Wil men de smooth-roughvariatie van de Typhusbacterie van een serologisch standpunt beschouwen, dan moet men zowel met het O-antigeen, als met het Vi-antigeen rekening houden.

Bij het opstellen van een nomenclatuur speelt een zekere willekeur altijd een rol, maar men moet zooveel mogelijk de natuurlijke groepeerings volgen.

De volgende nomenclatuur schijnt mij aan deze voorwaarde te voldoen.

Ik onderscheid:

- I. Smoothvorm, bevat O- en Vi-antigeen.
- II. O-halfsmoothvorm, bevat alleen O-antigeen.
- III. Vi-halfsmoothvorm, bevat alleen Vi-antigeen.
- IV. Roughvorm, bevat noch O-, noch Vi-antigeen.

De smoothvorm, die O- en Vi-antigeen bevat, heeft alle kenmerkende eigenschappen, als virulentie, stabiliteit in zoutoplossing, diffuse groei in bouillon, en een typische smoothkolonie.

Verliest de stam beide antigenen, dan gaat hij over in den roughvorm, die in mijn schema ook alle roughkenmerken heeft, autoagglutinantie, roughkolonievorm, avirulentie.

Het verlies van een van deze twee antigenen, onverschillig of dit het O-antigeen of het Vi-antigeen is, beteekent een degradatie in de richting van den roughvorm.

Serologisch is de stam dan halverwege in den roughvorm gedegradéerd. Daarom heb ik deze vormen halfsmoothvormen genoemd.

Aan den serologischen overgang van den smoothvorm in den roughvorm via den halfsmoothvorm loopt een geleidelijk verlies van andere smootheigenschappen parallel.

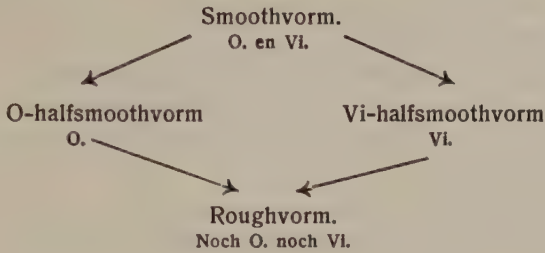
Bij overgang van den smoothvorm in den O-halfsmoothvorm heeft een verlies van virulentie plaats.

Bij overgang van den smoothvorm in den Vi-halfsmoothvorm, heeft ook een verlies van virulentie (naar men aanneemt), en soms van smoothkolonievorm plaats.

Bij den overgang van den halfsmoothvorm in den rough-

vorm wordt de stam autoagglutinabel, en krijgt een rough-kolonievorm.

Het volgende diagram geeft de smooth-roughvariatie van de Typhusbacil weer:



PAR. 9.

Vergelijking van mijn schema met dat van Kauffmann.

Wanneer men mijn schema met dat van Kauffmann vergelijkt, ziet men, dat in beide schema's dezelfde stammen tot één type samengevat worden.

Kauffmann onderscheidt naast elkaar:

- I. V-W-vormenwisseling, variaties in het Vi-antigeen. De V-vorm bevat Vi-antigeen, de W-vorm niet.
- II. De smooth-roughvormenwisseling, variaties in het O-antigeen. De smoothvorm bevat O-antigeen, de roughvorm bevat geen O-antigeen.

Bij de V-W-vormenwisseling heeft Kauffmann voornamelijk die stammen bestudeerd, die O-antigeen bevatten.

De V-W-vormenwisseling van stammen, die geen O-antigeen bevatten, noemt hij nauwelijks.

Dat de V-W-vormenwisseling van Kauffmann een smooth-roughvariatie is, heb ik uitvoerig uiteengezet.

De V-(smooth)-vorm van Kauffmann komt met mijn smoothvorm overeen.

De W-(smooth)-vorm van Kauffmann komt met mijn O-halfsmoothvorm overeen.

De V-(rough)-vorm van Kauffmann komt met mijn Vi-halfsmoothvorm overeen.

De W-(rough)-vorm van Kauffmann komt met mijn roughvorm overeen.

*PAR. 10.**Herkennen van serologische typen van de Typhusbacterie door middel van Vi-bacteriophagen.*

Door Sonnenschein werden bacteriophagen voor diagnostische doeleinden gebruikt. Hij gebruikte ook met succes Ty-specifieke bacteriophagen voor de Typhusdiagnostiek.

Het is nu bekend, dat de aanwezigheid van het Vi-antigeen voorwaarde is voor de gevoeligheid van Typhusstammen voor deze bacteriophagen.

Daar bijna alle Ty-stammen, die bij het routine-onderzoek geïsoleerd worden, het Vi-antigeen bezitten, is de Vi-bacteriophaga bruikbaar als diagnostiekbacteriophaga.

Daar men met deze phaag alleen op het Vi-antigeen reageert, kan deze methode onmogelijk superieur zijn aan de agglutinatie met een serum, dat zoowel H- als O- als Vi-agglutinen bevat.

Craigie beschrijft hoe hij met deze bacteriophagen het V-type van Kauffmann kan herkennen.

Met een Vi-bacteriophaga alleen kan men echter een stam, die O- en Vi-antigeen bevat niet onderscheiden van een stam, die alleen Vi-antigeen bevat.

Wanneer men evenwel ook let op de autogglutinabiliteit van den stam en van zijn secundaire cultuur na eventuele lysis door de Vi-bacteriophaga, zijn alle vier boven beschreven typen van elkaar te onderscheiden op de volgende manier:

Type I (O en Vi) en type III (Vi) zijn beide gevoelig voor de Vi-bacteriophaga. De secundaire cultures van type I zijn niet autoagglutinelabel, die van type III wel. Type II en IV zijn beide ongevoelig voor de Vi-bacteriophaga. Type II is echter niet autoagglutinelabel, type IV wel.

Samenvatting.

Hoewel de smooth-roughvariatie een serologisch begrip is, mag men niet ieder antigeenverlies willekeurig een smooth-roughvariatie noemen. Er moet aan dit antigeenverlies een virulentieverlies gepaard gaan.

Om een antigeenverlies een smooth-roughvariatie te noemen, kan men bij de Typhusbacterie de eisch stellen, dat met dit antigeenverlies gepaard gaan:

1. Verlies in virulentie;
2. Optreden van uiterlijke roughkenmerken.

Zoowel O- als Vi-antigeen der Typhusbacterie voldoen aan deze voorwaarden. De redenen waarom bij verlies van elk dezer antigenen slechts in bepaalde gevallen uiterlijke roughkenmerken optreden, werden uiteengezet. Zoowel het verlies van het Vi-antigeen, als het verlies van het O-antigeen moet een smooth-roughvariatie genoemd worden.

Rekening houdende met dit feit werd een nieuw schema voor de smooth-roughvariatie van de Typhusbacil vastgesteld.

Er werd een methode aangegeven om door middel van Vi-bacteriophagen alle variaties in lichaamsantigeen te herkennen.

Conclusies.

- I. Er is paralleliteit tusschen uiterlijke smootheigenschappen en antigeenstructuur der Typhusbacil.
- II. Stammen, die of O-antigeen, of Vi-antigeen alleen bevatten, en ook stammen, die beide antigenen bezitten, zijn niet autoagglutinel, en hebben meestal een smoothkolonievorm.
- III. Stammen, die noch O-antigeen, noch Vi-antigeen bevatten, zijn autoagglutinel en hebben een roughkolonievorm.
- IV. Er zijn geen factoren, die bij afwezigheid van deze twee antigenen Ty.-bacillen uiterlijke smootheigenschappen kunnen geven.
- V. Een schema voor de smooth-roughvariatie, als door mij gegeven, dat met deze feiten rekening houdt, dient gevolgd te worden.
- VI. Secundaire cultures, ontstaan na inwerking van Vi-bacteriophagen uit stammen, die O- en Vi-antigeen bevatten, bevatten alleen het O-antigeen, zijn niet autoagglutinel, en hebben een smoothkolonievorm.
- VII. Secundaire cultures, ontstaan na inwerking van Vi-bacteriophagen, uit stammen, die Vi-antigeen bevatten en geen

O-antigeen, zijn autoagglutinelabel, en hebben een rough-kolonievorm, ook indien de oorspronkelijke cultuur zowel een smoothkolonievorm had, als stabiliteit in zoutoplossing bezat.

Zij bevatten noch O-, noch Vi-antigeen.

LITERATUUR-OVERZICHT.

- ARKWRIGHT (1921) J. of Path. and Bact. **24**. 36.
 CRAIGIE AND BRANDON, J. of Path. and Bact. **43**. 233, 249.
 FELIX (1924) J. of Immunology. **9**. 115.
 FELIX AND PITT (1935) J. of Hyg. **35**. 428.
 KAUFFMANN (1936) Z. f. Hyg. **119**. 104.
 POT (1936) en DORNICKX, Tijdschrift v. Gen. **80** III 3457.
 SERTIC AND BOULGAKOV (1936) C. R. Soc. Biol. **122**. 35.
 SCHOLTENS, R. Th. (1936) J. of Hyg. **36**. 452.
 SONNENSCHNIG, C. (1925) Münchener Med. Woch. **34**. 1443.
 WHITE, P. B. (1925) Special Report Series, No. 92, 103. Med. Res. Council. London.
-

Onderzoekingen betreffende de schadelijkheid van minerale olie als plaatolie

DOOR

Dr. H. W. DE BOER

en

O. BOSGRA.

De vraag of minerale olie bij de broodbereiding mag worden gebruikt voor het invetten der platen, waarop en der blikken, bussen of pannen waarin het brood wordt gebakken, is reeds geruimen tijd geleden in ontkennenden zin beantwoord.

Reeds in 1896 vermeldt Professor Dunbar (1) te Hamburg een groot aantal vergiftigingsgevallen na het gebruik van brood, dat met behulp van minerale olie (Brotöl) was bereid. Niet alleen worden door Dunbar een aantal op zichzelf staande gevallen vermeld, doch ook bericht de schrijver twee gevallen van massa-vergiftiging. Het eene geval betreft salade met minerale geweerolie toebeleid, na het nuttigen waarvan 55 infanteristen ziek werden; het tweede geval betreft brood, waaraan minerale olie als bakkersvet was toegevoegd en dat bovendien op platen, welke met minerale olie waren ingesmeerd, was gebakken. Door het gebruik van dit brood werden in 20 gezinnen in totaal ongeveer 50 personen ziek.

In Dresden waren reeds voor 1893 „bedenkliche Erkränkungsfälle” bekend geworden (1), welke toegeschreven moesten worden aan het bestrijken met minerale olie van de platen, waarop koek werd gebakken, ten gevolge waarvan de Raad der stad Dresden in eene bekendmaking van 10 October 1893 waarschuwde tegen den verkoop en het gebruik van minerale olie (zgn. Patent Brotöl) voor dergelijke doeleinden.

In het volgende jaar, nl. in 1894, waarschuwde het Medicinal Collegium te Hamburg tegen het gebruik van minerale olie bij de broodbereiding. (2).

De vergiftigingsgevallen, welke voorkwamen, uitten zich

over het algemeen in hoofdpijn, duizeligheid, braken, buikpijn en -krampen, benevens diarrhee. Genezing trad doorgaans binnen enkele dagen weer in.

Door Dunbar werden, om de schadelijkheid van de minerale plaatolie vast te leggen, proeven genomen, zoowel met dieren als met menschen. Honden, welke werden gevoederd met brood, dat met minerale plaatolie was bereid en waarin tevens minerale olie als bakkersvet was verwerkt, werden ziek bij een verstreking van ongeveer 1 gram minerale olie per 7 Kg. lichaamsgewicht. Waar bij deze dierproeven dus betrekkelijk groote hoeveelheden minerale olie werden gebruikt, werden bij de daarop volgende proeven, waarvoor 7 medewerkers van Dunbar zich beschikbaar stelden, kleinere hoeveelheden aangewend. Van de 7 personen, die brood, met minerale olie bereid, nuttigden, werden 4 personen ziek en wel na het gebruik van $\frac{1}{2}$ en 1 gram minerale olie in totaal. De conclusie van Dunbar is, dat $\frac{1}{2}$ —1 gram minerale olie voor gezonde personen schadelijk is voor de gezondheid, terwijl hij veronderstelt, dat bij zieken en zwakken na het gebruik van een veel geringere hoeveelheid vergiftigingsverschijnselen kunnen optreden. Hij acht het gebruik van minerale olie bij de broodbereiding, in welken vorm dan ook, ontoelaatbaar.

Gedurende den oorlog werden in Duitschland wederom vergiftigingsgevallen geconstateerd en wel hoofdzakelijk na het gebruik van minerale olie als braadvet. Zoogenaamde „Bratheringe”, in blik verpakt, bij welker bereiding minerale olie was gebruikt, veroorzaakten talrijke vergiftigingsgevallen (3). Gelijksortige vergiftigingsgevallen, veroorzaakt door „Bratheringe”, werden geconstateerd en gepubliceerd door Prof. Keller. (4).

Deze en andere vergiftigingsgevallen hebben o.m. in Duitschland, Oostenrijk, België, Zwitserland en Frankrijk er toe geleid, dat in deze landen het gebruik van minerale olie als plaatolie bij de broodbereiding niet is toegelaten.

In België is nl. het gebruik van minerale olie bij K.B. van 28 September 1891—30 November 1904 — bij het branden van koffie „schadelijk verklaard voor de gezondheid en diensvolgens verboden”. Prof. van de Velde te Gent deelde mede, dat op grond van eene analogie-redeneering, het gebruik van minerale olie als plaatolie in België niet is toegelaten.

Volgens de Codex Alimentarius Austriacus IV—VI, Heft Brot und Backwaren, Backpulver, Sauerteig „ist das Bestreichen der Backbleche und -formen mit Vaselineöl (fälschlich „Brotöl genannt) unzulässig“.

Volgens „Rundschreiben des Reichsministers des Innern (— II 3028/20.8 — 27 August 1934) an die Landesregierungen, betr. Verwendung von Mineralölen bei der Herstellung von Backwaren“ (5), behooren in Duitschland stoffen zooals vloeibare paraffine (paraffinum liquidum), die een zekere laxeerende werking hebben, niet in levensmiddelen thuis en is het verkoopen van deze minerale olie aan bakkers voor het invetten van broodpannetjes en het bestrijken van brooden, een overtreding van § 3 van het „Lebensmittelgesetz“. Het met minerale olie gebakken brood moet worden beschouwd als vervalscht brood, omdat deze minerale olie bij het bakken een bestanddeel van de bakwaar wordt en als levensmiddel in den zin van het „Lebensmittelgesetz“ is op te vatten.

In Zwitserland worden volgens het „Eidgenössische Gesundheitsamt“ voor het invetten van bakvormen en bakplaten door de bakkers uitsluitend plantaardige en dierlijke oliën en vetten gebruikt. Minerale olie moet voor dat doeleinde verboden worden geacht; dit verbod berust op het voorschrift van „Art. 9 der eidgenössischen Lebensmittelverordnung vom 26 Mai 1936.“

De directeur van het „Laboratoire municipal de chimie“ te Parijs bericht betreffende het gebruik van minerale olie als plaatolie in Frankrijk het volgende:

„L'emploi de l'huile minérale pour graisser les moules de boulangers n'est pas licite en France; ce produit ne figurant pas parmi ceux dont l'emploi est autorisé par le décret du 15 avril 1912 et l'arrêté du 28 juin 1912, relatifs aux denrées alimentaires.“

Terwijl dit artikel was gereedgekomen en verzonden, verscheen het K.B. van 20 Aug. 1937 (No. 855) tot wijziging van het Broodbesluit, tengevolge waarvan ook in Nederland bij het bereiden van brood het gebruik van bakplaten en bakblikken, welke ingesmeerd zijn met minerale olie, is verboden.

Echter behoeft men niet alleen naar het buitenland te kijken, om vergiftigingsgevallen na het gebruik van minerale olie bij de bereiding van eetwaren te kunnen waarnemen. Vergiftigingsgevallen, veroorzaakt door het gebruik van z.g. raapolie, welke

grootendeels of geheel uit minerale smeerolie bestond, deden zich voor in Giethoorn (1907) (6), te Appingedam en te Assen (1908) (7). Een vergiftigingsgeval te Wehe, waarvan ons de bijzonderheden bekend werden, droeg zich als volgt toe:

Een medicus ten platte lande zond aan den keuringsdienst te Groningen olie, meel en stroop, gebruikt voor het bakken van pannenkoeken. Na het nuttigen daarvan waren meerdere personen zeer ernstig ziek geworden. Aangezien de ongesteldheid zich bij herhaling na het nuttigen van pannenkoeken had voorgedaan, werd gedacht, dat de olie wel de oorzaak zou zijn, omdat het meel en de stroop intusschen door andere hoeveelheden waren vervangen. Dit vermoeden bleek juist te zijn, aangezien de olie bij chemisch onderzoek voor meer dan 90 % uit onverzeepbare minerale olie bleek te bestaan.

Omstreeks 1916 deed zich te Nijmegen een vergiftigingsgeval voor na het nuttigen van minerale smeerolie door een kind, welke olie waarschijnlijk door een vergissing als levertraan was afgeleverd en als zoodanig door het kind was gebruikt.

Verder deden zich in de provincie Groningen in 1921 en 1932 vergiftigingsgevallen voor na het eten van oliebolletjes, visch en pannenkoeken, alle bereid met minerale olie. In 1936 werd in het keuringsgebied Dordrecht een geval van ernstige darmaandoening geconstateerd, na het gebruik van oliekoeken, in minerale olie gebakken, terwijl in 1936 in het keuringsgebied Haarlem zich in een gezin vergiftigingsverschijnselen voordeden, waarbij de mogelijkheid bestond, dat deze door koekjes veroorzaakt waren. Bij onderzoek bleek nl. ongeveer 5 % van het vet, in de koekjes aanwezig, onverzeepbaar te zijn, terwijl de fabrikant der koekjes erkende, bij de bereiding hiervan minerale olie te hebben gebruikt.

Wanneer men deze vergiftigingsgevallen beschouwt, valt op, dat slechts een zeer klein gedeelte daarvan werd geconstateerd na het nuttigen van de minerale olie als zoodanig, d.w.z. zonder dat deze met een voedingsmiddel was verhit. Het grootste deel der vergiftigingsgevallen had plaats na het gebruik van voedingsmiddelen, welke met behulp van minerale olie waren gebakken, dus waarbij minerale olie en de voedingsmiddelen samen aan een hooge temperatuur waren blootgesteld geweest. Wij brengen zulks naar voren, omdat bij ons de vraag voorlag,

of minerale olie, zooals deze in den tegenwoordigen tijd als plaatolie en ook wel als surrogaat voor spijsolie in den handel wordt gebracht, bij de bereiding van brood en andere voedingsmiddelen kon worden toegelaten. Deze minerale olie is nl. zoodanig geraffineerd, dat zij voldoet aan de eischen in de pharmacopee gesteld aan vloeibare paraffine (*paraffinum liquidum*), welke als geneesmiddel en wel voor inwendig gebruik is bestemd.

De minerale olie, waaraan een groot deel der vermelde vergiftigingsgevallen is te wijten, bestond nl. uit slechts ten deele gezuiverde minerale smeerolie, welke waarschijnlijk reeds bij rechtstreeks inwendig gebruik, d.w.z. zonder verhitting met voedingsmiddelen, min of meer giftig was. Het is nl. een bekend feit, dat alle fracties, welke door destillatie uit de ruwe aardolie worden verkregen, giftig zijn. Dit geldt zoowel voor de petroleum-aether en petroleum-benzine fractie, welke tusschen 40 en 150° C. wordt overgedestilleerd, als voor de petroleum fractie, (150—300° C.), als voor de tot 300° C. niet vluchtige, hooger kokende bestanddeelen, waaruit o.m. de minerale smeerolie bestaat. Aan gezien echter na het gebruik van minerale olie, zooals deze in den laatsten tijd in den handel wordt gebracht en die, zooals wij reeds mededeelden, zoodanig is gezuiverd, dat zij voldoet aan de eischen, aan medicinale vloeibare paraffine (voor inwendig gebruik) gesteld, toch vergiftigingsverschijnselen werden geconstateerd (keuringsgebieden Dordrecht en Haarlem), kwam bij ons de vraag op, of deze op zich zelf niet direct giftige minerale olie, misschien door het verhitten met voedingsmiddelen zoodanige verandering ondergaat, dat deze olie of de ontledingsproducten daaruit, weer min of meer schadelijke eigenschappen krijgen.

Alvorens tot de bespreking der dierproeven over te gaan, welke door ons werden genomen, moeten wij er op wijzen, dat zelfs het gebruik van uitstekend geraffineerde minerale olie, welke bij oppervlakkige beschouwing onschadelijk voor de gezondheid is bij inwendig gebruik, voor de bereiding van spijzen en dranken, uit verschillende oogpunten beschouwd, op zijn minst bedenkelijk moet worden geacht.

1e. Al wordt plaatolie in kleine hoeveelheden gebruikt (een broodblikje, waarin een brood van 400 gram wordt gebakken, kan worden ingevet met 1—2 gram olie), de olie, welke op deze wijze aan het brood wordt toegevoegd, verhoogt de voe-

dingswaarde daarvan, indien zij nl., zooals tot dusver algemeen gebruikelijk was, uit een eetbare en verteerbare olie bestaat. De olie, waarmede de platen worden ingesmeerd, dringt nl. geheel of grootendeels tot eenige mm. diep in de korst van het brood en wordt met het brood genuttigd.

Zonder eenigen twijfel moet deze olie worden beschouwd als een grondstof, welke niet alleen wordt gebezigd om te voorkomen, dat het brood aan het broodblik vastbakt, doch welke olie ook ten doel heeft, de korst van het brood een aantrekkelijk bruinebakken uiterlijk en een eetlust opwekkende geur te geven.

De hoeveelheid plaatolie, welke door bakkers in ons land wordt gebruikt, is ons weliswaar niet nauwkeurig bekend, doch deze kan op de volgende wijze bij benadering worden geschat.

Bij een aantal bakkers is door ons opgenomen, de hoeveelheid plaatolie, welke zij gebruikten, benevens de hoeveelheid bloem, welke per jaar werd verbakken. Wij komen dan tot het volgende gemiddelde:

Bij een aantal bakkers is door ons opgenomen, de hoeveel-zoowel brood, als koek, banket, beschuit enz. werd bereid) 15 Kg. plaatolie te worden gebruikt. Aangezien volgens mededeeling van het Centraal Bureau voor de Statistiek het binnenlandsch verbruik aan tarwebloem in 1934 en 1935 circa 600 miljoen Kg. bedroeg (nl. 592 miljoen Kg. in 1934 en 613 miljoen Kg. in 1935) moet het jaarlijksch verbruik aan plaatolie in ons land op 900.000 Kg. worden geschat.

Het gaat er dus om, of een hoeveelheid van bijna 1 miljoen Kg. tot dusver eetbare en verteerbare plantaardige olie, welke bij de broodbereiding voor een groot deel in het brood dringt en daarmede wordt genuttigd, kan worden vervangen door een geheel waardelooze, onverteerbare minerale olie.

2e. Vloeibare paraffine (paraffinum liquidum) wordt gebruikt als geneesmiddel, aangezien deze stof een laxeerende werking heeft. Het is o.i. bedenkelijk, bij de broodbereiding een dergelijke stof te gebruiken, ook al is het in kleine hoeveelheden, aangezien daardoor de geheele bevolking aan het gebruik van een stof, welke is bedoeld als geneesmiddel, wordt gewend.

3e. Reeds voor 1929 was het verschillenden onderzoekers, die zich bezighielden met het bestudeeren van den invloed van vitaminen op het dierlijk organisme, opgevallen, dat de voor een bepaalde diersoort minimaal benoodigde, doch juist voldoende,

hoeveelheid vitamine A, (in boter aanwezig) onvoldoende wordt, wanneer naast boter minerale olie wordt verstrekt. (8).

Nadat Moore omstreeks 1929 ontdekte (9), dat carotine het provitamine is van het daaraan verwante vitamine A, werd door Helen S. Mitchell (10) gevonden, dat minerale olie de opname van vitamine A uit spinazie door het dierlijk organisme buitengewoon benadeelt. Bij ratten was een 10—12 maal groo-tere hoeveelheid spinazie (als vitamine A-bron) noodig, om bij gelijktijdige toediening van $\frac{1}{2}\text{cm}^3$ minerale olie, eene zelfde ge-wichtstoename te bereiken, als bij proefdieren, welke naast spi-nazie geen minerale olie toegediend kregen. De benodigde hoe-veelheid spinazie was nog 8 maal zoo groot, indien de toediening van minerale olie en spinazie niet gelijktijdig geschiedde, doch minstens 6 uur uit elkaar lag.

Door Jackson (11) werd hetzelfde gevonden betreffende de absorptie van in maïs aanwezige vitamine A.

Door Dutcher, Harris, Hartzler en Guerrant (12) werd in 1934 aangetoond, dat het niet hoofdzakelijk het vitamine A is, waarvan de absorptie bij aanwezigheid van minerale olie wordt geschaad, doch dat het vooral het pro-vitamine carotine is, waarvan het oplossend vermogen in minerale olie zoo groot is, dat daardoor de absorptie van carotine door de lipoiden van de darmsappen wordt verhinderd. Hiermede werd verklaard, dat niet dezelfde resultaten werden verkregen, indien naast lever-traan als vitamine A-bron, minerale olie werd verstrekt (13).

Dat minerale olie echter ook nadeelig werkt op de absorptie door het dierlijk organisme van vitamine D uit levertraan, werd aangetoond door Dutcher, Ely en Honeywell (14), zoomede door Hawk, Levine, Stuckey en Oser (15).

Door Prof. Grossfeld (16) wordt er dan ook op gewezen, dat minerale olie niet alleen waardeloos is voor de voeding, maar onder bepaalde omstandigheden zelfs schadelijk moet worden geacht, omdat het twee bijzondere gevolgen veroorzaakt.

Ten eerste werkt minerale olie merkbaar laxeerend. Al-hoewel medisch van deze eigenschap in bepaalde gevallen een nuttig gebruik wordt gemaakt, kan toch niet worden toege-laten, dat deze werking in ongewenschte gevallen bij niets-vermoedende gebruikers wordt opgewekt.

Ten tweede lost minerale olie in het darmkanaal uit het voedsel een groot deel van de in vet oplosbare vitaminen op

en geeft deze vitaminen, in tegenstelling met verteerbare olie, bij het verdere verteringsproces niet weer af. De minerale olie werkt dus als het ware vitamine-absorbeerend en vitamine-uitschuddend op den maag- en darminhoud en beïnvloedt daardoor de vitamine-opname door het organisme op nadeelige wijze.

Meerdere onderzoekers wijzen er op, dat bovenvermelde schadelijke invloed van minerale olie op het vitamine-absorbeerend vermogen vooral tot uiting zal komen, indien het organisme nog juist de minimaal benodigde hoeveelheid vitamine A (carotine) en/of vitamine D met het opgenomen voedsel tot zich neemt. Indien daarnaast geringe hoeveelheden minerale olie worden genuttigd, kunnen schadelijke gevolgen (a- of hypovitaminosen) optreden, welke schadelijke gevolgen zouden zijn uitgebleven, indien opname van minerale olie achterwege was gebleven.

Experimenteel gedeelte.

Uit een oriënteerend oogpunt werden door ons in 1935 proeven genomen met twee groepen kuikens, waarvan de eene groep werd gevoederd met broodkorst, afkomstig van brood, hetwelk met minerale olie als plaatolie was gebakken, terwijl de andere groep werd gevoederd met broodkorst, afkomstig van brood, gebakken met behulp van een plantaardige olie (nl. soya-olie) als plaatolie. Elke groep bestond uit 3 kuikens; teneinde een verschil in groeivermogen van deze beide groepen te elimineren, werd na een week de proef onderbroken, gedurende de daarop volgende week aan beide groepen normaal voedsel verstrekt en werd daarna de proef voorgezet, doch zoodanig, dat groep 2, welke de eerste week minerale-olie-broodkorst kreeg, normale broodkorst ontving en de 1e groep, welke gedurende de eerste week normale broodkorst toegediend kreeg, met minerale-olie-broodkorst werd gevoederd.

Gedurende de eerste week ontvingen beide groepen per dag het volgende voedsel:

- 20 gram broodkorst (al of niet met minerale olie gebakken);
- 10 gram opfokvoer;
- 15 gram kuikenzaad;
- 20 gram gesneden gras.

Gedurende de tweede week ontvingen beide groepen hetzelfde normale, voor kuikens gebruikelijke gemengde voedsel; gedurende de derde week ontvingen beide groepen per dag het volgende voedsel:

28 gram broodkorst (al of niet met minerale olie gebakken);

15 gram opfokvoer;

20 gram kuikenzaad;

25 gram gesneden gras.

De broodkorst, welke van het minerale-olie-brood afkomstig was, bevatte per 343 gram in totaal opgevoerde broodkorst, volgens chemisch onderzoek in totaal 3,8 gram minerale olie.

De broodjes, waarvan deze broodkorst afkomstig was, bleken ± 1 gram minerale olie per broodje van 400 gram te bevatten.

De resultaten van de proef zijn vermeld in overzicht I.

OVERZICHT I (APRIL 1935).

GROEP I.		GROEP II.	
3 kuikens, gevoerd met korst van brood, bereid met soya-olie als plaatolie.		3 kuikens, gevoerd met korst van brood, bereid met minerale olie als plaatolie.	
Gewichtstoename der kuikens.		Gewichtstoename der kuikens.	
in grammen totaal	in grammen per 100 gram begingewicht	in grammen totaal	in grammen per 100 gram begingewicht
1e week 161	56,1	1e week 124	44,6
2e week pauze in de eigenlijke proef (normaal voedsel)		2e week pauze in de eigenlijke proef (normaal voedsel)	
Omwisseling der kuikens		Omwisseling der kuikens	
3e week 281	45,8	3e week 204	30,4
Samen 442	Gemiddeld 51,0	Samen 328	Gemiddeld 37,5
		(achterstand vergeleken met groep I: 26,5% van den groei van groep I)	

De voor deze proef gebruikte minerale olie was een bijna kleurlooze, reuklooze en smaaklooze, niet fluoresceerende olie, welke aan een bakker in deze provincie als plaatolie was geleverd en welke geheel voldeed aan de eischen in de Pharmacopée Ed. V. aan paraffinum liquidum gesteld.

Zooals uit het overzicht blijkt, nam de groep kuikens (met verwisseling der proefdieren, gevoederd met korst van normaal brood in gewicht gemiddeld 51 % van het begingewicht toe, terwijl de groep kuikens, gevoederd met korst van minerale-oliebrood in gewicht 37,5 % van het begingewicht toenam. Dit aanmerkelijke verschil moet ons inziens o.m. worden toegeschreven aan het feit, dat de minerale olie, welke op zichzelf onschadelijk was, door de verhitting met organische stoffen (de bestanddeelen van het brood) werd ontleed, onder vorming van voor den groei van het organisme schadelijke ontledingsproducten.

Proeven, welke wij namen op geheel dezelfde wijze met behulp van caviae, wezen geheel in dezelfde richting. Ook gaven proeven, genomen op dezelfde wijze, doch waarbij de kuikens werden gevoederd met brood, hetwelk meer minerale olie bevatte, gelijksoortige resultaten, welke weliswaar nog meer sprekend waren, doch welke hier niet worden vermeld, aangezien bij ons de meening voorlag, dat alleen de uitslag der proeven met brood, op normale wijze bereid, van invloed op onze conclusies zou mogen zijn.

Ondertusschen was bij bovenvermelde proef geen rekening gehouden met den invloed, welke de onverhitte minerale olie als zoodanig zou kunnen uitoefenen, terwijl bovendien geen rekening was gehouden met het feit, dat elk broodje, dat is gebakken met minerale olie en waarin 1 gram minerale olie is ingedrongen, iets minder voedende bestanddeelen bevat dan een broodje, gebakken met behulp van een normale plantaardige verteerbare plaatolie.

In April 1937 werden de proeven voortgezet, waarbij met de ondervinding, opgedaan met de tot dusver genomen oriënteerende proeven, rekening kon worden gehouden.

Bij deze meer uitgebreide proeven werden 4 groepen van 6 kuikens (van bij den aanvang 9 dagen oud) gebruikt.

Groep I werd, behalve met het normale voedsel, dat alle groepen ontvingen, gevoederd met 35 gram normaal brood per dag (luchtdroog brood, met de korst samen goed fijngesneden).

Groep II werd op dezelfde wijze gevoederd, doch met 35 gram met behulp van minerale plaatolie gebakken brood.

Na een week proefneming werd 2 dagen rust gehouden en daarna werden de kuikens van deze 2 groepen onderling verwisseld, teneinde verschil in groeivermogen van de 2 groepen

kuikens uit te schakelen. Dit leek ons noodzakelijk, omdat elke groep tenslotte slechts 6 kuikens bevatte; door verwisselen der proefexemplaren halverwege den tijd gedurende welke de proef werd genomen, werd een eventueel nog bestaand verschil in groeivermogen geheel uitgeschakeld.

Groep III ontving, behalve het normale voedsel, per dag 35 gram brood, dat op normale wijze was bereid, dus met een plantaardige olie als plaatolie, doch waaraan bovendien na het bakken 2 gram minerale olie per brood van 400 gram was toegevoegd.

Groep IV werd, behalve met het gewone voedsel, gevoederd met 35 gram brood per dag, hetwelk bestond uit met behulp van minerale plaatolie gebakken brood, doch waaraan na de bereiding 1,6 gram verteerbare plantaardige plaatolie per brood van 400 gram was toegevoegd. De kuikens van groep III en groep IV werden ook na 1 week en 2 rustdagen onderling verwisseld.

Bij proefneming vooraf bleek ons, dat, indien de blikjes (pannetjes) waarin brooden van 400 gram worden gebakken, op normale doch eenigszins zorgvuldige wijze worden ingesmeerd met minerale olie, daarvoor een hoeveelheid van ongeveer 2 gram nodig was.

Werden dezelfde broodblikjes ingesmeerd met een normale eetbare plantaardige plaatolie, dan was voor de insmering van een dergelijk blikje ongeveer 1,6 gram olie nodig.

Daar de viscositeit van de olie afhankelijk is van de temperatuur, is met eenigszins warme olie zuiniger in te smeren dan met olie, welke op een koele plaats heeft gestaan en daardoor een lage temperatuur heeft.

Alle 4 groepen van onze proefdieren kunnen met elkaar worden vergeleken.

Een verschil in groei tusschen de groepen I en II wordt veroorzaakt:

- a. doordat het minerale-olie-brood van groep II per broodje van 400 gram 1,6 gram verteerbare olie minder bevat;
- b. door eventuele oplossing van vitaminen in minerale olie en verhindering van de absorptie hiervan;
- c. door eventuele giftige stoffen, welke gedurende de verhitting en de inwerking van de organische stoffen van het brood op de minerale olie, ontstaan.

Een verschil in groei tusschen de groepen III en IV kan alleen zijn teweegebracht door de hierboven sub c vermelde oorzaak, nl. het ontstaan van schadelijke stoffen door de verhit-ting van minerale olie met organische stoffen.

Een verschil in groei tusschen de groepen I en III zou kun-nen zijn veroorzaakt door den invloed van minerale olie op de vitaminen-absorptie.

Een verschil in groei tusschen de groepen II en IV zou kun-nen zijn veroorzaakt door de grootere voedingswaarde, welke het met minerale olie gebakken brood, waaraan bovendien 1,6 gram verteerbare plantaardige plaatolie is toegevoegd, heeft ten opzichte van het brood, dat met minerale olie is gebakken, doch waaraan geen plantaardige olie is toegevoegd.

Een verschil in groei tusschen de groepen I en IV zou kun-nen worden toegeschreven aan de hierboven onder b en c ge-noemde oorzaken.

Een verschil in groei tusschen de groepen II en III zou kun-nen zijn teweegebracht door de oorzaken onder a en c ge-noemd.

De vergelijking tusschen de groepen I en II en tusschen de groepen III en IV, waar het ons in de eerste plaats om begonnen was, is het zuiverst, omdat bij deze groepen een verschil in groeivermogen is geëlimineerd, doordat na een week (en een rustperiode van 2 dagen) de kuikens, waarmede de proeven werden verricht, werden omgewisseld.

Schematisch zou een en ander als volgt kunnen worden voorgesteld:

I—II =	oorzaak a+b+c	}	verschil in groeivermogen volkomen uitgeschakeld.
III—VI =	„ c		
I—III =	„ b	}	verschil in groeivermogen minder volledig opgeheven.
IV—II =	„ a		
I—IV =	„ b+c		
III—II =	„ a +c		

Uit de resultaten van deze proef, welke zijn vermeld in over-zicht II, blijkt:

Een zeer opvallend verschil in groei tusschen de groepen I en II.

Aangezien uit het verschil in groei tusschen de groepen II en IV blijkt dat de invloed van de 1,6 gram verteerbare plant-

aardige plaatolie, welke het op normale wijze gebakken brood meer bevat dan het met minerale olie gebakken brood, betrekkelijk gering is, moet dus het verschil in groei tusschen de groepen I en II hoofdzakelijk worden toegeschreven aan de oorzaken onder b en c genoemd.

OVERZICHT II (APRIL 1937).

GROEP I.			GROEP II.		
Gevoederd met brood, bereid met soya-olie als plaatolie.			Gevoederd met brood, bereid met minerale olie als plaatolie.		
Gewichtstoename der kuikens.			Gewichtstoename der kuikens.		
in grammen totaal		in grammen per 100 gram begingewicht	in grammen totaal		in grammen per 100 gram begingewicht
1e week	91	27,7	1e week	79	24,6
2 dagen pauze in de eigenlijke proef (normaal voedsel)			2 dagen pauze in de eigenlijke proef (normaal voedsel)		
Omwisseling der kuikens			Omwisseling der kuikens		
2e week	88	19,4	2e week	54	11,5
Samen	179	Gemiddeld 23,55	Samen	133	Gemiddeld 18,05
			(achterstand vergeleken met groep I: 23,4 % van den groei van groep I).		
GROEP III.			GROEP IV.		
Gevoederd met brood, bereid met soya-olie als plaatolie, aan welk brood bovendien daarna 2 gram minerale olie per brood van 400 gram werd toegevoegd.			Gevoederd met brood, bereid met minerale olie als plaatolie, aan welk brood bovendien daarna 1,6 gram soya-olie per brood van 400 gram werd toegevoegd.		
Gewichtstoename der kuikens.			Gewichtstoename der kuikens.		
in grammen totaal		in grammen per 100 gram begingewicht	in grammen totaal		in grammen per 100 gram begingewicht
1e week	86	25,9	1e week	79	24,2
2 dagen pauze in de eigenlijke proef (normaal voedsel)			2 dagen pauze in de eigenlijke proef (normaal voedsel)		
Omwisseling der kuikens			Omwisseling der kuikens		
2e week	83	18,2	2e week	56	12,1
Samen	169	Gemiddeld 22,05	Samen	135	Gemiddeld 18,15
			(achterstand vergeleken met groep III: 17,7% van den groei van groep III).		

Aangezien een verschil tusschen de groepen I en III wel bestaat, is een invloed welke van de minerale olie uitgaat op het vitamine-absorbeerend vermogen, misschien wel aanwezig, doch wij achten zulks niet bewezen. Het veel grootere verschil echter in groei tusschen de groepen I en II (dan tusschen I en III), benevens het verschil in groei tusschen de groepen III en IV, wijst er o.i. duidelijk op, dat door de verhitting van minerale olie met de organische stoffen van het brood, schadelijke stoffen ontstaan (ontledingsproducten van de minerale olie), welke den groei van het organisme in zeer merkbare mate hinderen.

Aan diezelfde oorzaak is het verschil in groei tusschen de groepen II en III, te wijten, alhoewel zooals boven is vermeld, het individuele verschil in groeivermogen door verwisseling der kuikens halverwege de proef hier niet kon worden geëlimineerd. Wel werd gezorgd, dat de verlichting en de temperatuur in de kooien, waarin zich de 4 groepen kuikens bevonden, benevens alle andere omstandigheden geheel dezelfde waren, zoodat door verschil hierin geen groeiverschil kon ontstaan.

Uit het chemisch onderzoek der brooden, welke waren gebakken met behulp van 2 gram minerale olie per blikje, bleek, dat in een brood van 400 gram nog ongeveer 1 gram minerale olie kon worden aangetoond (berekend uit het verzeepingsgetal). Aangezien aan het brood, waarmede groep II werd gevoederd echter 2 gram minerale olie (onverhit) werd toegevoegd, zou een groeiverschil, dat geweten moet worden aan oorzaak c, nog grooter kunnen zijn; de invloed, welke eventueel aan oorzaak b zou worden toegeschreven, zou dan echter kleiner worden; het bestaan van oorzaak b volgt dus uit de door ons verrichte proeven niet met zekerheid. Gedurende het bakproces vervluchtigt dus een deel van de minerale olie, hetgeen overigens ook kon worden geconstateerd in de bakkerijen, waar deze minerale olie werd gebruikt, aangezien gedurende het bakken zich een hinderlijke, naar een petroleumproduct riekende walm in de bakkerij ontwikkelde. De 35 gram luchtdroog brood, welke 6 kuikens samen per dag ontvingen, bevatten nog 90 mgr. minerale olie, zoodat elk kuiken, gevoederd met het zgn. minerale-olie-brood, per dag ongeveer 17 mgr. minerale olie met het voedsel tot zich nam.

De eindresultaten van de genomen proeven zijn de volgende:

Kuikens, gevoederd met brood, dat is gebakken in broodblikjes, welke op normale wijze zijn ingevet met minerale olie (nl. ± 2 gram minerale olie per blikje, bestemd voor een brood van 400 gram), blijven in groei aanmerkelijk achter, vergeleken met kuikens, welke worden gevoederd met gewoon brood, dat dus is gebakken in blikjes, met een plantaardige plaatolie ingevet.

De conclusie, welke wij hieruit trekken, is, dat het gebruik van minerale plaatolie bij de broodbereiding en ook bij de bereiding van andere waren, waarbij verhitting van de minerale olie plaats heeft, niet mag worden toegestaan, omdat het brood en de waren, op bovenvermelde wijze bereid, schadelijk voor de gezondheid moeten worden geacht.

Deze schadelijkheid zal bij een belangrijk voedingsmiddel zooals brood is, vooral tot uiting kunnen komen, indien het de voeding van kinderen, zieken, zwakken of herstellenden betreft.

Zusammenfassung.

In der Literatur findet man sehr viele Vergiftungsfälle angeführt, welche durch den Gebrauch von Mineral-öl bei der Bereitung und Zusammenstellung von Nahrungsmitteln verursacht sind.

Auch in den Niederlanden sind einige Vergiftungsfälle bekannt geworden.

Wenn diese Vergiftungsfälle vorkommen nach dem Gebrauch von unraffiniertem Mineral-öl, kann man diese teilweise zurückführen auf die Giftigkeit an sich des unraffinierten oder nur teilweise raffinierten Mineral-öles.

Vergiftungsfälle, vorkommend nach dem Gebrauch von Mineral-öl bei der Bereitung von Nahrungsmitteln, welches Mineral-öl an sich unschädlich ist und den Ansprüchen genügt, welche in chemischer Hinsicht in der Niederländischen Pharmacopee Ed. V an Paraffinum Liquidum für inwendigen Gebrauch gestellt sind, können dann jedoch nicht erklärt werden.

Aus den genommenen Tierproben (mit Kücken) kam jedoch festzustehen, dass Kücken, die mit Brot gefuttern wurden, welches mit Mineral-öl als Blechöl gebacken wurde, ansehnlich in Gewichtszunahme zurückblieben verglichen mit Kücken, die gefüttert wurden mit Brot, welches mit normalem Brotöl gebacken war.

Dieser Rückstand im Wachstum ist grösser als der Eigenschaft von Mineralöl zugeschrieben werden muss, um Vitamine aufzulösen und deren Absorption durch den Organismus störend zu beeinflussen.

Wir kommen darum zu der Hypothese, dass bei der Erhitzung von Mineralöl mit den organischen Bestandteilen der Nahrungsmittel, Zerlegungsprodukte entstehen, welche störend wirken auf das normale Wachstum des Organismus und unter gewissen Umständen Vergiftungserscheinungen hervorrufen können.

LITERATUUR.

- 1) Prof. Dr. Dunbar, Zur Frage über die Gesundheitsschädlichkeit von Erdölrückständen. Deutsche med. Wochenschr. **22**, 33 (1896).
- 2) Jahresber. Nahrungsmittelamt Hyg. Inst. Hamburg. (1895). Veröffentlichungen des Reichsgesundheitsamts. 88 (1894).
- 3) Klostermann, Scholta, Über Verwendung von Mineralöl an Stelle von Bratfett. Z. Nahr. Genussm. **32**, 353 (1916).
- 4) Keller, Mineralöl als Bratfett. Z. Nahr. Genussm. **33**, 114 (1917).
- 5) Gesetze und Verordnungen. Z. Nahr. Genussm. **68**, 67 (1934).
- 6) Jaarverslag Staatstoez. Volksgez. 290 (1907).
- 7) Volgens een rapport in 1915 door den Inspecteur van de Volksgezondheid uitgebracht aan Gedeputeerde Staten van Noord-Holland.
- 8) Dutcher, Ely, Honeywell, Vitamin studies. XV Assimilation of vitamins A and D in presence of mineral oil. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **24**, 953 (1927).
Burrows, Farr, The action of mineral oil per os on the organism. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **24**, 719 (1927).
Jackson, The effect of mineral oil administration upon the nutritional economy of fat-soluble vitamins. J. Nutrition. **4**, 171 (1931).
- 9) Moore, Vitamin A and carotene.
 - I. The association of vitamin A activity with carotene in the carrot root. Biochem. J. **23**, 803 (1929).
 - II. The vitamin A activity of red palm oil carotene.
 - III. The absence of vitamin D from carotene.
 - IV. The effect of various dietary modifications upon vitamin A activity of carotene. Biochem. J. **23**, 1267 (1929).
 - V. The absence of the liver oil vitamin A from carotene.
 - VI. The conversion of carotene to vitamin A in vivo. Biochem. J. **24**, 692 (1930).
- 10) Mitchell, Influence of mineral oil on assimilation of vitamin A from spinach. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **31**, 231 (1933-34).
- 11) Jackson, The effect of mineral oil administration upon the nutritional economy of fat-soluble vitamins. J. Nutrition. **7**, 607 (1934).

- 12) Dutcher, Harris, Harzler, Guerrant, The assimilation of carotene and vitamin A in the presence of mineral oil. J. Nutrition. **8**, 269 (1934).
 - 13) Zie Dutcher, Ely, Honeywell 8).
Dutcher, Harris, Harzler, Guerrant 12).
Rowntree, The effect of the use of mineral oil upon the absorption of vitamin A. J. Nutrition. **3**, 345 (1931).
 - 14) Zie Dutcher, Ely, Honeywell 8).
 - 15) Hawk, Levine, Stuckey, Oser, The effect of mineral oil on the utilization of vitamins A and D in cod liver oil. Abstr. paper, Am. Chem. Soc. Meeting. Minneapolis (1929).
 - 16) Grossfeld, Weitere Versuche über Fettbestimmungen mit bestimmter Lösungsmittelmenge. Z. Nahr. Genusm. **72**, 418, (1936).
-

Some notes on the influence of light on coloured coli-media

BY

F. LIEBERT and L. KAPER.

In the Journal of Bacteriology (Amer.)¹⁾ A. J. Salle proposed „A system for the bacteriological Examination of Water”. This system is based on the use of a presumptive test in a fluid medium, which is prepared as follows: — Bacto-peptone (Difco) 15 grms, K_2HPO_4 15 grms, KH_2PO_4 3 grms, lactose 15 grms, crystal violet (1 : 5,000) 21.5 c.c., H_2O to 2,000 c.c. The water-sample is mixed with twice its volume of this medium.

As a confirmatory test he uses a solid medium of the following composition: — Bacto-peptone (Difco) 10 grms, K_2HPO_4 3 grms, KH_2PO_4 0.6 grms, agar 20 grms, H_2O 1,000 c.c. To 100 c.c. of this agar is added 0.5 grms lactose, 2 c.c. erythrosine (2% aqueous), 0.2 c.c. methylene blue (1% aqueous) and 2 c.c. bromcresol purple (1% alcoholic).

It was found in our laboratory that Salle's solid medium was very selective for the members of the coli-aerogenes group, as, for instance, only colonies of *B.coli* or *B.aerogenes* developed after 24 hours incubation at 37° C. from 1 c.c. of water-samples taken in a very polluted canal. Therefore we thought it perhaps possible that for the enumeration of the members of the coli group in other water — such as drinking water — for which Salle worked out his system, the use of this agar medium only would be sufficient.

On this medium the coli can be clearly distinguished from the aerogenes, as only the colonies of the former can produce enough acid out of the lactose to form an orange-yellow ring (the acid colour of the bromcresol purple) and moreover these colonies take a greenish metallic lustre; the colonies of the

¹⁾ Vol. 20, 381 (1930).

aerogenes, which produce far less acid, are blueish, non-metallic, and have no yellow halo. We found that the metallic lustre is also a product of the acid; it is caused by a thin layer of microscopic crystals of the non-soluble erythrosine which layer shows the so-called „surface colour” of this acid dye ²⁾).

As the medium is rather buffered by the phosphates, it is very important, in order to get clear results, that the layer of the agar should be rather thin, otherwise there is obviously too much of the phosphates present in the immediate neighbourhood of the colonies, which neutralise the acid formed by the bacteria. It may be mentioned here that a quantity of 20 c.c. agar for a petri dish of 15 cm. diameter was found to be satisfactory.

In some cases, however, the results with this agar medium were very irregular, insofar that certain plates, inoculated with a water sample which was known to be strongly polluted, showed not a single colony of coli. Nevertheless, several other plates, made the day before out of the same batch of medium, gave quite definite results.

In the beginning we were quite at a loss to understand what the reason was for this peculiar behaviour of different plates made out of the same batch of medium, till we noticed on one of the plates, which had given far too few colonies, a very slight discolouration of the medium. This pointed to the influence of light.

It may be mentioned here that the Salle media were handled in the same manner as the ordinary broth medium. That is to say that they were guarded against direct sunlight, but not against the ordinary daylight in the laboratory. It was an easy matter to make absolutely sure that it was the light that made the Salle medium poisonous. It is already known, from the earlier days of bacteriology, that sunlight can make broth unfit for bacteria, but we found that on the Salle media the light had a far stronger influence than on ordinary noncoloured media.

It was found that pieces of filter paper soaked in solutions of the three dyes which are used by Salle, namely methylene blue, bromcresol purple and erythrosine, are all easily bleached. Therefore it was thought that a toxic product was formed in the course of the bleaching of these dyes. A series of experiments

²⁾ Vide: Oberflächenfarben, A. Eibner, Handb. d. Naturwissenschaften, Jena, Tome 3,839.

showed that this was not the case, as in the plates with the ordinary stock medium of Salle, with one of the dyes or a combination of two of them, exposed simultaneously to the same electric arc, only those of the plates which contained erythrosine, either in combination with the other two dyes or alone, were rendered poisonous. In these experiments, and also in those mentioned hereafter, we used a parallel beam from a 10 A direct current arc between ordinary carbons. The beam was made parallel by a lens of a diameter of 14 cm. and a focus of 15 cm. As the plates were inoculated with *B. coli* after their „sunbath”, and were only exposed to a very subdued light during inoculation, and as the incubator was quite dark, it was certain that either the light made a poison out of the erythrosine itself, or that the poison was made under the influence of that dye, and it was not a case of „photodynamic” or direct action of light on the bacteria.

As it was not entirely impossible that light decomposed the erythrosine and formed an iodate or iodide, a series of broth cultures was made, and rising quantities of iodide or iodate were added. It was found that sodium iodide and potassium iodate were not specific poisons for *coli* or aerogenes. They thrive very well in much higher concentrations of these salts than the maximum that can be obtained from the quantity of erythrosine used.

Another series of experiments was made in order to see if the peptone or the lactose of the medium played an important part in the forming of the poison. In order to solve this question media with erythrosine and 1% peptone and sodium citrate or glucose were inoculated with *B. aerogenes* (after exposing the media to light) and also the same was done with a medium without peptone but with NH_4Cl and lactose. In all the cases the non-exposed dishes showed abundant growth, but the exposed agar was clearly poisonous as the aerogenes did not form any colonies. So neither the carbohydrate nor the peptone were factors in the production of the poison.

In order to see if the unknown poison were stable, some plates were kept in the dark for 24 hours after the exposure to light. It was found that after that period the exposed medium had not totally lost its poisonous character.

The experiments above mentioned were all made with agar medium in petri dishes which were exposed without covers, so

that the surface of the agar received the full light. In order to rule out the possible influence of the agar, the media of Salle without agar was put into ordinary test tubes and exposed to light in an approximately horizontal position, so that the light had to travel only through a thin layer of the fluid. It showed that without agar the poison was also formed, but as the depth of the layer was greater than in solid agar medium the exposure to light in that case had to be somewhat longer. It was found that in ordinary citrate medium³⁾, with the same concentration of erythrosine as is used in Salle's medium, the poisonous substance was somewhat more readily formed than in peptone broth with erythrosine.

After having made quite sure that light and erythrosine formed a poisonous substance, other dyes, which also are markedly fluorescent, were tried; namely fluoresceine and eosin; and it was found that they showed the same behaviour after exposure to light.

As in these strongly coloured media it is not easy to see the colour-change made by a chemical reagent, it was a very good thing that eosin and erythrosine are only soluble in water as salts and are absolutely insoluble in an acid medium, as the citrate media had only to be slightly acidified with diluted H_2SO_4 , in order to throw down the erythrosine or eosin quantitatively so that the dyes could be filtered off. These filtrates were quite uncoloured. In the case of fluoresceine only a slight trace of a yellow colour in the filtered fluid was still to be seen.

In order to see if any hydrogen peroxide were formed, some starch solution and some drops of diluted sulphuric acid were added to the uncoloured solution, and after bubbling carbonic acid through the solution in order to expel any oxygen some crystals of potassium iodide were added. It goes without saying that, as the amount of free iodine formed is always very small, some precautions must be taken here, namely oxygen must be absent, the test tubes must be kept in the dark as much as possible, and the added potassium iodide must be quite free from iodate. (We found only one sample of potassium iodide (Schering) quite satisfactory in this respect). As we were aware that the starch reaction, strictly speaking, only showed the presence of an oxidizing agent in the exposed medium, we used as reagent,

³⁾ Made after the American standard methods, Ed. VI.

also a solution of titanium sulphate in diluted sulphuric acid, which showed, by forming the strong yellow titanium peroxide, that undoubtedly hydrogen peroxide was present. When fluoresceine is precipitated with acid from the solution of sodium salt of that dye, the filtrate will show a very slight trace of yellow colour. It is very advisable to compare the yellow colour formed by the titanium peroxide in a control tube with part of the filtrate to which no titanium sulphate has been added.

A biochemical reaction on hydrogen peroxide, namely the forming of gas bubbles by the enzyme katalase was also used. The enzyme was freshly made by digesting ground cow-liver with water, separating the fluid by use of a centrifuge, and throwing down the raw enzyme from the solution with alcohol and drying the precipitate in vacuo. When a trace of the katalase was put in a test tube with exposed medium (without agar) some little gas bubbles were clearly seen with a magnifying glass. They took their origin on the particles of undissolved raw katalase lying at the bottom of the test tube.

In order to make quite sure that the hydrogen peroxide was the operating poison, half the surface of a petri dish of Salle's agar, after having been exposed to light and having the whole agar surface inoculated with a suspension of *B.coli*, was smeared with two drops of a solution of katalase in water. Care was taken that no katalase was transferred from one side to the other. The result was very striking. At one side, where the katalase had split the hydrogen peroxide into water and oxygen, a multitude of colonies of *B.coli* developed after only eighteen hours of cultivation, and on the other side not a single colony was visible.

As it is well-known that *B.coli* contains katalase, another experiment was made in order to show the effect of the bacterial-katalase itself. On an exposed Salle-plate were put several drops of an emulsion of *B.coli*. After about 5 minutes the drops were smeared over the total surface of the agar in the ordinary way. After cultivation only on those places where the droplets had originally lain colonies were formed, as in those spots the *B.coli* itself had produced sufficient katalase to diminish the hydrogen peroxide in such a degree as to make growth possible. Outside the border of the original droplets there was no colony whatever but on the non-exposed control plate

inoculated with the same number of bacteria the agar was crowded.

The same effect can be obtained in fluid media. Four tubes with ordinary citrate medium and 0.02% erythrosine were exposed to light; directly after that two of them were inoculated with *B.aerogenes* and to two other some katalase was added before inoculation. The addition of katalase in those cases made the medium quite non-poisonous as was shown by the rich cultures of *aerogenes* after incubation for 20 hours. In the tubes without katalase there was no growth whatever.

In all the experiments mentioned above, the petri dishes and tubes were inoculated after exposure to light. Some experiments were also made by exposing to light agar media, which were previously inoculated on the surface, so that the bacteria were lying on the coloured agar. In these cases we had also the so-called photodynamic effect. For purposes of comparison a series of dishes without dyes were also exposed during, $\frac{1}{2}$, 1, 2, 4, 8, 16 and 45 minutes, and all showed abundant growth. The media, where the *B.coli* had lain on the surface of the agar which contained 0.04% erythrosine, showed after 2 and 4 minutes exposure only a few colonies, and after 30 and 45 minutes exposure there was not a single colony to be seen after 24 hours incubation.

In these circumstances katalase can also save the life of many exposed bacteria, as shown by the following experiment. Two dishes with Salle stock agar and 0.04% erythrosine were inoculated and on half the surface of the agar some drops of katalase solution were spread and exposed for 10 and 20 minutes. On the katalase side there grew 155 and 150 colonies; on the non-katalase side there was not a single colony in either case. On the non-exposed control plate 370 colonies had developed.

Another series of experiments was made with an acid quinine sulphate filter in a beam of light, in order to filter out any ultraviolet light, which might still have passed the fairly thick collecting glass lens. After 8 and 15 minutes exposure the bacteria in both cases were killed, but adding katalase before exposure made it possible for them to develop to colonies. When they were exposed for 30 and 45 minutes, in both cases the katalase was not able to save the life of the *B.coli*. These

experiments showed also that ultra-violet rays are not absolutely necessary for the forming of H_2O_2 .

Comparing these results with those previously obtained, it is clear that when bacteria are exposed to light in an environment containing such dyes as erythrosine, eosin or fluoresceine, they are killed in a far shorter time than is necessary in those experiments where the media were inoculated after exposure to light. The reason is obvious, as living *B. coli* absorb a certain amount of dye from the solution used. The colouration of the single individuals is not strong enough to be distinctly seen under the microscope, but when the suspended bacteria are concentrated by centrifuge, the layer is very distinctly coloured, and when this layer is suspended in water again, in order to wash away the adhering dye and again precipitated, their colour is still pink. It is obvious that in bacteria which contain the dye, H_2O_2 can be formed inside the cells, where that substance has the greatest effect, and so the time necessary for killing the bacteria is shortened.

As formation of H_2O_2 in meat agar, when exposed several hours to sunlight, was known in the earlier days of bacteriology, it may be of some interest to mention here the fact that ordinary broth often shows a just perceptible fluorescence.

It will readily be seen that when erythrosine is added to culture media, the quantity of H_2O_2 formed must be far greater, as this dye is one of the strongest fluorescent substances known, and therefore, when exposed to light, a much greater part of the light is turned into radiant energy of greater wavelength, — a physical process accompanied in these cases by the formation of H_2O_2 .

It may be useful to mention here that in order to prevent the formation of this poisonous substance, it is quite sufficient to take the same precaution when handling this medium as that which is necessary when using ordinary printing-out paper.

It goes without saying that in other culture media: for instance Levine's agar: where eosin is added H_2O_2 may also be formed. However, as the layer of agar may be thicker in that case than in the case of Salle's medium, as there is no yellow halo to observe, the concentration of the H_2O_2 is obviously less, as the H_2O_2 is only formed at the surface of these deeply

coloured media and it is thought that this is the reason why this phenomenon was not noticed before.

The experiments mentioned above showed why, in some cases, the results with Salle's agar were irregular, and taught us that one must take the precaution of not exposing that medium to full light before the colonies are formed. It stands to reason that, when the colonies are developed, they cannot easily be influenced by light of ordinary intensity, as in that case there is sufficient katalase formed to destroy immediately any hydrogen peroxide.

It is not considered that this slight inconvenience is a reason for the rejection of the use of Salle's agar for surface cultivation, as it is well balanced by certain advantages: firstly, colonies are well developed after 18 hours incubation at 37° C.; and, secondly, the difference between true coli and true aerogenes is very striking, if one uses a thin layer of agar in a dish with a plane bottom, and if the dishes are inspected after 18—24 hours cultivation. After that time the yellow ring may become less clear when the colonies are crowded, because there is not sufficient carbohydrate left to enable the colonies to form as much acid as is lost by diffusion and neutralisation.

Mixing the sample with the agar is not to be recommended as the metallic lustre is not developed by those colonies which are embedded in the agar.

Den Helder, June 1937.

Rijksinstituut voor Chemisch, Microbiologisch en
Hydrografisch Visscherijonderzoek.

ANTONIE VAN LEEUWENHOEK

WETENSCAPSLIEVER, VERVOLGERS, EN
 VERVOLGDE. EEN VERHAAL VAN
 ZIJN LEVEN EN WERK.
 VAN DE J. VAN LEEUWENHOEK, A. N. N.

De Nederlandsche Maatschappij van Wetenschappen heeft de eer te vermelden
 dat de heer J. van Leeuwenhoek, geboren te Delft den 24sten October 1634,
 overleden te Amsterdam den 26sten September 1723,

een groot en voortdurend wetenschappelijk genie was, en dat hij de eerste was
 die de natuur der dieren en planten heeft ontdekt.

De Nederlandsche Maatschappij van Wetenschappen heeft de eer te vermelden
 dat de heer J. van Leeuwenhoek, geboren te Delft den 24sten October 1634,
 overleden te Amsterdam den 26sten September 1723,

een groot en voortdurend wetenschappelijk genie was, en dat hij de eerste was
 die de natuur der dieren en planten heeft ontdekt.



ANTONIE VAN LEEUWENHOEK

NEDERLANDSCH TIJDSCHRIFT VOOR
HYGIËNE, MICROBIOLOGIE EN SEROLOGIE

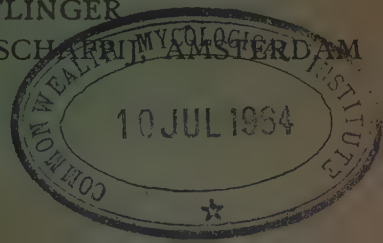
Orgaan van de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologia



Onder redactie van Prof. Dr. W. C. DE GRAAFF, Hoogleraar a. d. Rijksuniversiteit
te Utrecht en Dr. W. Aeg. TIMMERMAN, Directeur van het
Rijks Instituut voor de Volksgezondheid te Utrecht.

Vaste medewerkers: Prof. Dr. L. DE BLIECK (Utrecht), Prof. Ir. B. VAN DER BURG
(Wageningen), J. P. BIJL (Utrecht), Dr. W. DOORENBOS (Alexandrië), Prof. Dr. P. C.
FLU (Leiden), Dr. T. FOLPMERS (Rotterdam), Dr. J. A. VAN HASSELT (Amsterdam),
Dr. J. VAN DER HOEDEN (Utrecht), Prof. G. KAPSENBERG (Groningen), Prof. A. KLEIN
(Den Haag), Prof. Dr. A. J. KLUYVER (Delft), Prof. Dr. J. J. VAN LOGHEM (Amsterdam),
Dr. P. A. MEERBURG (Bussum), Dr. S. L. SCHOUTEN (Utrecht), Prof. Dr. W. A. P.
SCHÜFFNER (Amsterdam), Prof. Dr. J. SMIT (Wageningen), A. J. VITRINGA (Amsterdam),
Prof. Dr. JOH^A WESTERDIJK (Baarn), Prof. L. K. WOLFF (Utrecht).

N.V. SWETS EN ZEITLINGER
BOEKHANDEL EN UITGEVERSMACHTSCHAAP AMSTERDAM



INHOUD.

	Blz.
1. DR. T. FOLPMERS, Verslag van de vergadering der Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie	173
2. DR. A. CHARLOTTE RUYS, Veranderlijkheid van tuberkel-bacillen van het bovine-type	179
3. DR. A. TASMAN en DR. A. C. BRANDWIJK, Stofwisselingsproeven met <i>C. Diphtheriae</i> . II	187
4. DR. L. E. DEN DOOREN DE JONG, De gedragingen van <i>Azotobacter</i> onder normale voedingscondities en radiumbestraling	203
5. DR. A. W. POT, De regeneratie van zoogenaamde „gaslooze” paras-typhusstammen in calcium-formiaat-peptonwater	212
6. W. A. COLLIER en M. J. VERHOOG, Het p-aminobenzolsulfamide als resistentie-beïnvloedende „Wirkstoff”	215
7. DR. SARDJITO en DR. A. MOCHTAR, Een poging tot het cultiveeren van lepra-bacillen	222

Verslag van de vergadering der Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie, gehouden te Amsterdam op Zaterdag 13 November 1937.

Deze wintervergadering werd gehouden in het laboratorium voor de Gezondheidsleer onder voorzitterschap van prof. dr. P. C. Flu. Nadat eenige huishoudelijke zaken waren afgedaan, werd in het officieele gedeelte medegedeeld, dat in den zomer bericht is ontvangen van dr. Th. M. Rivers, president van het 3e Internationale Congres voor Microbiologie, dat de vereeniging gemachtigd is op te treden als nationale groep in de Internationale Vereeniging en dat prof. dr. A. J. Kluyver haar zal vertegenwoordigen in de permanente internationale commissie. In de kascommissie tot het nazien van het beheer der penningmeesteres werden benoemd dr. A. Tasman en dr. A. Pondman, die hun benoeming aanvaardden. Prof. dr. G. Grijns trad af als Bestuurslid; nadat de Voorzitter hem op hartelijke wijze bedankt had voor zijn vele werkzaamheden in het belang der Vereeniging, werd in diens plaats benoemd Mej. Prof. dr. Joh. Westerdijk.

Den Secretaris van het Nederlandsch Natuur- en Geneeskundig Congres werd besloten mee te deelen, dat de bijdrage der Vereeniging voor de Inventarisatie van bibliotheken gedurende twee achtereenvolgende jaren telkens f25.— zou bedragen.

De voorjaarsvergadering zal worden gehouden in den Haag op Zaterdag 2 April 1938.

In het wetenschappelijk gedeelte sprak dr. L. E. Den Dooren de Jong over: De gedragingen van *Azotobacter* onder abnormale voedingscondities en radiumbestraling.

Deze voordracht is in dit nummer opgenomen. Prof. dr. J. Smit vraagt, waarom spreker den groei van *Azotobacter* op een stikstofvrij milieu als abnormaal beschouwt en of men wel het recht heeft een voedingsbodem normaal te noemen. Spreker

is het met de opmerking eens, dat men eenigen voedingsbodem moeilijk normaal kan noemen, doch in de N. vrije milieu's vertoont *Azotobacter* gewone celvormen en men heeft dus waarschijnlijk wel het recht deze te beschouwen als het dichtste bij den natuurlijke voedingsbodem te komen.

Ir. P. B. Rottier vraagt, waaraan spreker de veranderingen in de celvormen meent te moeten toeschrijven? Deze antwoordt, dat de oorzaak een duister probleem is en gelijkgesteld kan worden met het optreden van kankercellen in de weefsels van hogere organismen.

Daarna sprak dr. A. Tasman over: Glucosevergiftiging door diphtheriebacteriën. Deze voordracht is eveneens in dit nummer opgenomen. Ze gaf geen aanleiding tot vragen.

Vervolgens behandelde dr. J. Mulder het onderwerp: *Haemophilus influenzae* als ubiquitaire bronchitisverwekker.

Daar op het oogenblik de verwekker van de influenza als filtrabel virus bekend is, is het van groot belang de rol van haemoglobinoφιiele bacteriën bij deze ziekte en bij de gewone bronchitis en broncho-pneumonie te leeren kennen. Spreker onderzocht gedurende 9 jaar bij alle gevallen van bronchitis en broncho-pneumonie de bacterieële flora en vond H. infl. bij het meerendeel van die lijders, die etterig sputum opgaven en wel zeer vaak in reïncultuur. Daar H. infl. met de grootste waarschijnlijkheid moet worden beschouwd als een parasiet, volgt uit de waarnemingen, dat de meeste gevallen van etterige bronchitis, die elken winter, doch ook wel in den zomer optreden, door H. infl. verwekt worden. Voor de capillaire bronchitis is dit regel. Men moet zich echter ervoor hoeden in de toekomst in de fout van 1918 te vervallen en eerst naar H. infl. te gaan zoeken, als influenza als contagieuze epidemische ziekte optreedt.

H. infl. is een ubiquitaire slijmvliesparasiet van ten minste even groote algemeene ziekte-makende beteekenis als de pneumococcen.

Vóór de middagpauze laat prof. dr. G. Kapsenberg een aantal cultuurbuizen zien met den voedingsbodem van Löwenstein, welke buizen op een andere wijze dan gewoonlijk met tuberkelbacillen, afkomstig van een Löwensteincultuur, beënt zijn. In plaats van een gelijkmatige uitbreiding over het oppervlak wordt op drie plaatsen een weinig materiaal gebracht. Er komen dan aldaar reuzenkolonies te voorschijn. Deze laten b.v. zeer duidelijk

het verschil tusschen smooth en roughvariatiën zien. Spreker beveelt deze methode aan voor hen, die zich speciaal met de morphologie van de tuberkelbacillenculturen bezighouden, daar de beelden, die men verkrijgt, zoo duidelijk zijn.

Gedurende den koffiemaaltijd demonstreerde prof. dr. J. J. van Loghem eenige bacteriologische en serologische onderwijsfilms, o.a. een film over de techniek der agglutinatie en over de uitvoering der Wassermann-reactie, vervolgens over het bereiden van koepokstof.

Na den koffiemaaltijd sprak prof. dr. J. J. van Loghem ter inleiding van het volgend onderwerp over: De herkenning van den cholera-vibrio.

R. Gispén, arts behandelde daarop het onderwerp: De vibriën van Gardner's groep I.

Beide voordrachten zullen in het tijdschrift verschijnen. Prof. dr. A. J. Kluyver merkt op, dat, indien er tusschen *Vibrio cholerae* en *Vibrio El-Tor* een absoluut verschilpunt bestaat wat betreft de aerobe glycolyse, dan moet daarop zeker een routine-proef te baseeren zijn. Waarschijnlijk is evenwel, dat nader onderzoek zal leeren, dat ook dit verschilpunt slechts van graadueelen aard is.

Vervolgens deelt dr. W. Ph. de Vogel het volgende mede:

Van een epidemiologisch standpunt uit gezien, zou het wel belangrijk zijn, indien de El Tor vibrio nog al eens bleek voor te komen in een land zooals ons Indië, waar in de laatste 17 jaren geen cholera-epidemiën meer zijn voorgekomen. Want dit zou de opvatting steunen, dat deze vibrio geen uitgangspunt levert voor cholera-epidemiën, hoewel zij serologisch niet te onderscheiden is van de versch uit cholerafaeces te kweeken, en dan niet haemolyseerende choleravibrio. Die opvatting berust — zooals waarschijnlijk bekend is — op de overweging dat Gotschlich in 1905 en nu in den laatsten tijd Doorenbos geregeld jaarlijks bij een zeker percentage Noordwaarts huistoe keerende pelgrims, die alle in El Tor onder waarneming worden gesteld, de haemolyseerende vibrio aantreft bij enkele min of meer aan diarhoea lijdenden, zonder dat eenige plausibele reden bestond cholera-infectie tijdens de zoo pas afgeloopen bedevaart aan te nemen. Voorzichtigheidshalve liet in den aanvang de Egyptische Regeering zulke dragers niet in haar land toe, alvorens van de verdachte kiem te zijn gereinigd. Zij was echter niet bij machte dit

zelfde te eischen voor zoover betreft pelgrims die in Noord-Afrika, Palestina of Albanië thuis hoorden. Deze bereikten hun land door het kanaal van Suez in quarantaine te passeeren, en toch vernam men ook in die landen niets van na hun thuiskomst voorgekomen cholera-explosies.

In dit verband heeft mij zooveel belang ingeboezemd, het resultaat van het uitgebreide onderzoek, dat Dr. Meertens, de Directeur van het Geneeskundig Laboratorium te Batavia, over het voorkomen van den El Tor vibrio met lofwaardige volharding verrichtte bij niet minder dan pl.m. 28.000 inwoners van onzen sinds zoo vele jaren cholera-vrijen Archipel.

De mij medegedeelde voorloopige uitkomst van dit onderzoek laat ons over het uit een epidemiologisch oogpunt al of niet gevaarlijke van de El Tor Vibrio even wijs. Voorloopig werden nl. onder de in de onderzochte faeces gevonden vibrionen, geen El Tor vibrionen aangetroffen. Of nu het zoo pas gevonden op cholera gelijkende geval te Makassar, waarbij volgens de couranten El Tor vibrionen zouden zijn gevonden, ons in dat opzicht meer licht zou kunnen verschaffen meen ik voorloopig te moeten betwijfelen. Te meer waar, zooals ik gisteren mocht vernemen, de autoriteiten in Indië zelf in opvatting verschillen, of men hier met de El Tor vibrio dan wel met een cholera verwekker te doen heeft.

Het verheugt mij daarom, dat uitzicht bestaat op verwezenlijking van het voorstel van Dr. Mertens, dat het onderzoek naar het voorkomen van den El Tor vibrio nu zal worden voortgezet onder de bevolking van, en het water der bronnen in de Hedjaz zelf, waar sinds 1931 geen cholera explosies meer voorkwamen. Een positieve uitkomst zou geruststellend zijn.

Als derde spreker in de middagvergadering deelde H. D. Mayer, biol. docts., iets mee over: „Tibi” en de dit product constitueerende micro-organismen.

Een paar jaar geleden was o.m. in Zwitserland een zwak alcoholische drank in de mode, welke werd bereid met een symbiotisch product „Tibi” genaamd. Dit product bestaat uit glazige, gelatineuze, veelal door platte of schelpvormige vlakken begrensde klompjes. Dit materiaal blijkt reeds in 1890 te Parijs als „graines vivantes” bekend te zijn geweest. De bewuste zuurzoete, mousseerende, alcoholhoudende drank kan worden bereid door een 15 pct. rietsuikeroplossing, waaraan men eenige ge-

droogde of verse vijgen, druiven en wat citroensap heeft toegevoegd, te laten vergisten onder invloed van een hoeveelheid dezer korrels; deze vermenigvuldigen zich tijdens de gisting.

Het door spreker ingestelde onderzoek heeft geleerd, dat deze „Tibi” vrijwel zeker identiek is met de reeds in 1892 door Ward beschreven symbiose „de Ginger-Beer Plant”, waarmee in de laatste helft der vorige eeuw in Engeland Ginger-Beer werd bereid.

De Tibi-symbiose bevat als essentieële elementen een gist: *Saccharomyces intermedius* en een heterofermentatieve melkzuurbacterie, nl. de species: *Betabacterium vermiforme*. Het is spreker gelukt door een combinatie dezer beide organismen de symbiose wederom samen te stellen.

Op grond van de recente onderzoekingen van Orla-Jensen mag worden besloten, dat verschillende bioactivatoren bij de stikstofvoeding der melkzuurbacteriën een belangrijke rol spelen; het ligt dus voor de hand te besluiten, dat de aanwezigheid van de gist in de Tibi-korrel o.m. aan de ontwikkeling der bacterie ten goede komt, en wel door afscheiding van organisch stikstofmateriaal.

De symbiose heeft blijkbaar ook nog de beteekenis, dat zij de bacterie voor dissociatie behoedt en daardoor het voortbestaan der symbiose helpt verzekeren.

Ten slotte sprak mej. dr. A. Ch. Ruys over: Het isoleeren van tuberkelbacillen en de veranderlijkheid van het bovine type.

Deze voordracht verschijnt eveneens in het tijdschrift. Naar aanleiding van de voordracht vraagt dr. G. Tierie: Kunnen bovine tuberkelbacillen in het lichaam van den mensch veranderingen ondergaan, zoodat ze bij isolatie groeien als het humane type? Mej. Ruys antwoordt daarop: De terstond bij de isolatie eugonische stammen waren volgens de ervaringen van talloze onderzoekers en van mij zelve volgens de virulentie voor het konijn steeds van het humane type. De genoemde verandering komt dus waarschijnlijk niet, althans hoogst zelden voor.

Prof. C. F. van Oyen deelt mede, dat bij het kweken van tuberkelbacillen uit melk 1½% zwavelzuur reeds schadelijk werkt. In haar antwoord zegt Mej. Ruys de voorbehandeling met een sterkere concentratie zwavelzuur zeker als een nadeelige behandeling te beschouwen, welke echter voor het kweken uit sputa en maagspoelsels niet te vermijden is.

Dr. L. S. den Dooren de Jong vraagt of de voedingsbodem van Löwenstein de voorkeur verdient boven dien van Petrag-nani, waarop Mej. Ruys antwoordt, dat ze de beste uitkomsten had met de voedingsbodem van Löwenstein. Verder vraagt hij nog, hoe lang men de maagspoelsels moet laten staan voor men ze kan inspuiten, in verband met de inwerking van het maagsap. Op deze vraag antwoordt Mej. Ruys, dat verreweg de meeste spoelsels door het transport eerst na 24 uur behandeld konden worden. Een klein aantal uit de stad werd direct ingespoten. Hierbij ontstonden niet meer phlegmones.

Vervolgens sloot omstreeks vijf uur de Voorzitter de druk bezochte vergadering met eenige woorden van hartelijken dank aan den gastheer.

De secretaris
Dr. T. FOLPMERS.

Veranderlijkheid van tuberkelbacillen van het bovine type¹⁾

DOOR

Dr. A. CHARLOTTE RUYS, *privaat-docent*.

Voor het isoleeren van tuberkelbacillen maakt men thans in de meeste laboratoria gebruik van den voedingsbodem van Löwenstein (1), voor het humane type voorzien van glycerine, voor het bovine type zonder. Deze voedingsbodem heeft bovendien het voordeel, dat de groeiwijze van de beide hier genoemde typen in den regel zoo karakteristiek is, dat het dikwijls reeds mogelijk is hieruit het type te herkennen. Het humane type groeit in dikke, droge, bloemkoolachtige roomkleurige kolonies, beter op den voedingsbodem met dan op dien zonder glycerine (eugonisch). Het bovine type daarentegen groeit op beide media glad, vochtig en gelijkmatig, iets rijker op den voedingsbodem zonder dan op dien met glycerine (dysgonisch). Om met zekerheid het type vast te stellen is het voor de dysgonische stammen steeds noodig de virulentie voor het konijn te bepalen, b.v. door enting in de bloedbaan van 0,01 mgr. versehe cultuur uit den voedingsbodem van Besredka. De virulente bovine stam doodt het konijn binnen 3 maanden, terwijl een virulente humane stam in deze dosis slechts geringe afwijkingen bij het konijn veroorzaakt. De reeds in eerste enting typisch „humaan” groeiende stammen kan men alleen op het uiterlijk reeds als zoodanig determineeren. Groote moeilijkheden leveren soms de stammen, die zich atypisch verhouden, hetzij in groeiwijze, hetzij in virulentie. De groeiwijze kan van dien aard zijn, dat de vraag opkomt of men met een menginfectie of met het

¹⁾ Gedeelte van een voordracht, gehouden op de Vergadering van de Nederl. Ver. voor Microbiologie te Amsterdam, op 13 November 1937.

overgaan van het eene type in het andere te maken heeft.

Jensen en Frimodt—Møller (2) hebben een aantal atypische stammen beschreven, gedeeltelijk van het humane, gedeeltelijk van het bovine type. Zij wijzen erop, dat de groei van normaal virulente bovine stammen soms eugonisch kan worden. Zij namen dit echter slechts zelden waar (1 op 300). Griffith (3) schrijft, dat bovine stammen op ei-media met glycerine voortgekweekt in groeiwijze variëeren. Ook andere onderzoekers o.a. Laporte en Battaglini (4) hebben een enkele maal bij een typisch bovine cultuur eugonische groeiwijze zien ontstaan, waarbij de virulentie voor het konijn niet veranderde. Valtis en van Deinse (5), die een dergelijke cultuur beschreven, zagen na caviapassage de abnormale groeiwijze weer verdwijnen. Laporte (6) zag 5 van 30 stammen uit runderen eugonisch worden. In het begin kwam na dierpassage de dysgonische groei weer terug, in latere passages niet meer. Hij meent, dat men hier te maken heeft met een selectie van de beter groeiende exemplaren, waarbij tenslotte de geheele stam in een avirulente eugonische cultuur zou overgaan.

Eigen onderzoek. Langdurige observatie van een aantal bovine stammen heeft ons geleerd, dat bij kweken op den voedingsbodem van Löwenstein het uiterlijk van deze stammen zeer veranderlijk is. Tenslotte is soms de groeiwijze bijna niet meer te onderscheiden van die van het humane type.

Drie en veertig bovine stammen, waarvan één uit de Rijks Serum Inrichting te Rotterdam en 42 door ons zelf geïsoleerd, hebben wij meer dan $1\frac{1}{2}$ jaar onder controle gehad. Onze eigen stammen waren afkomstig van organen van runderen (2), melk (1) en van zieke menschen (12 uit sputa, 13 uit maagspoelsels, 7 uit pus, 6 uit huidafwijkingen en 1 uit lumbaalvocht). De stammen zijn iedere 8-10 weken overgeënt steeds op den voedingsbodem van Löwenstein met en zonder glycerine. Vijf en dertig stammen hebben binnen dezen waarnemingstijd van $1\frac{1}{2}$ jaar veranderingen in groeiwijze vertoond, 8 zijn in dit tijdsbestek uiterlijk gelijk gebleven maar 4 hiervan hebben wij bij langere observatie nog zien veranderen. De na $1\frac{1}{2}$ jaar nog typisch dysgonisch groeiende stammen waren afkomstig uit koeien (2), maagspoelsels (3), sputa (3); degene, die hierna nog veranderden waren 1 uit koeienlong, 2 uit sputum en 1 uit maagspoelsel.

FOTO I.



a

b

c

d

FOTO IV.



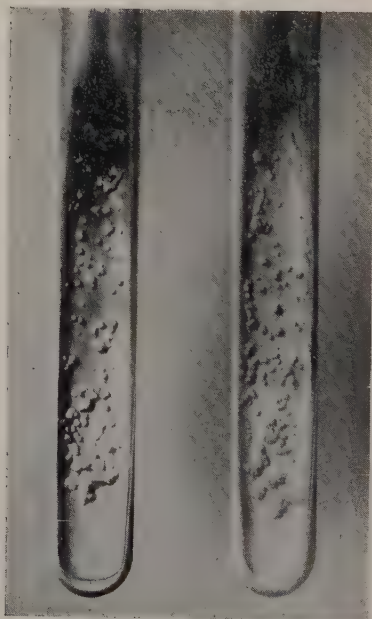
FOTO II.



e

f

FOTO III.

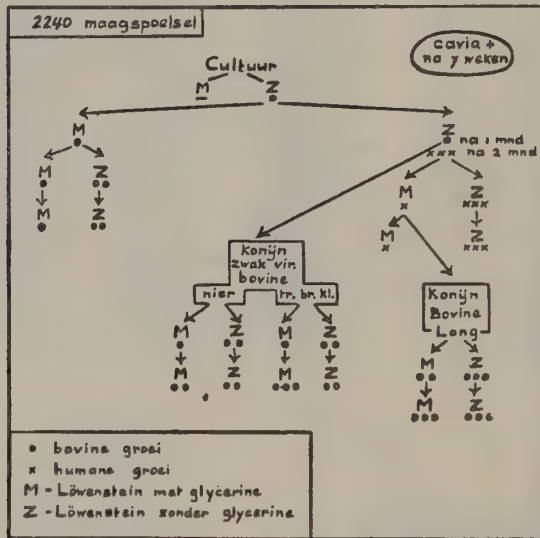


g

h

die het verloop van een aantal proeven met eenige van dergelijke stammen weergeven.

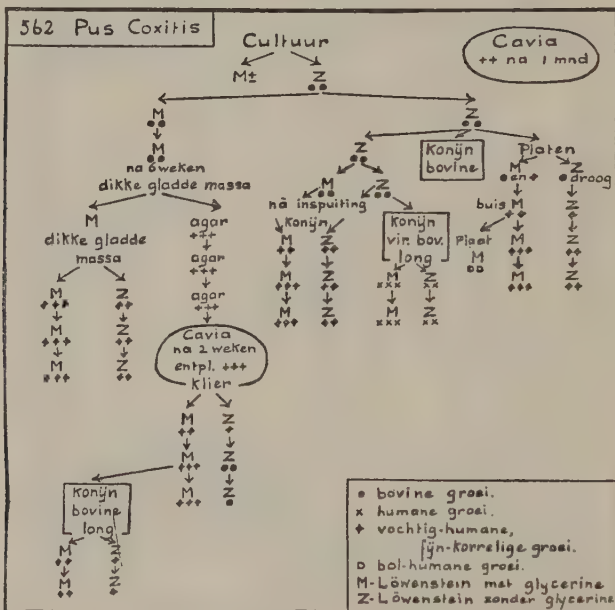
In *schema I* (112) ziet men, dat de cultuur op de beide voedingsbodems aanvankelijk typisch dysgonisch was en een voor het bovine type karakteristieke hoge virulentie voor het konijn had. Na eenige overentingen werd de groei echter eugonisch en geleek uiterlijk op een stam van het humane type. De virulentie voor het konijn bleef evenwel hoog. De eigenaardige groei, die ons eerst aan de mogelijkheid van een ver-



Schema II.

ontreiniging met zuurvaste saprophyten deed denken, was aanleiding een reeks passages over bouillon-agar te probeeren, met de bedoeling zoo een scheiding te krijgen tusschen eventueel aanwezige saprophyten en tuberkelbacillen. Na 8 agar passages (zie foto IV) bleek echter de cultuur nog tuberkelbacillen te bevatten; deze waren zeer virulent voor de cavia en de hieruit gekweekte stam was weer sterk virulent voor het konijn. Na de cavia passage groeide de stam eerst in bolvormige kolonies en later weer als het humane type (foto III, g). Helaas is verzuimd uit de organen van het konijn nog weer een cultuur te maken.

was virulent voor een konijn en het uiterlijk bleef ook na passage door het konijn dysgonisch, de groei was echter het sterkst op den voedingsbodem met glycerine. De directe cultuur uit de pus op het medium met glycerine was aanvankelijk ook typisch dysgonisch, maar na 2 maanden ontstond een bloemkoolachtige kolonie hier boven op, hetgeen zeer sterk aan een menginfectie met het humane type deed denken. Van den top van deze kolonie werd weder geënt en na een aantal passages, ook over platen, gelukte het een typisch eugonische cultuur te krijgen. Een hier-



Schema IV.

mee ingespoten konijn stierf na 2 maanden met sterke afwijkingen. Hieruit werden weer uitsluitend eugonische kolonies gekweekt. Al geelk deze stam dus ten slotte wat groeiwijze betreft op het humane type, de virulentie voor het konijn toonde aan, dat wij niet met een menginfectie te doen hadden maar met een bovine stam, waarvan een deel eugonisch geworden was.

Schema 4 (562) laat een cultuur zien, die direct na isolatie een voor het bovine type karakteristieke groeiwijze en virulentie had. Een deel van de cultuur bereikte na 3 overentingen op bouillon-agar, passage door een cavia en een konijn (virulen-

tie : bovine type) een groeiwijze, die vochtig korrelig was, het sterkst op het medium met glycerine. Een ander deel van den stam werd in dysgonische vorm bij een konijn geënt (virulentie : bovine type) maar vertoonde na isolatie uit het konijn de karakteristieke groei van het humane type (zie foto II).

Men ziet uit deze enkele voorbeelden, dat zoowel bij voortkweken op den voedingsbodem met glycerine als op dien zonder glycerine de bovine stammen een sterke neiging tot het vormen van ruwere, grovere kolonies gaan vertoonen, bij den eenen stam eerder, bij den anderen later. Eerst is nog meestal de groei op het glycerine vrije medium het sterkst, later is dikwijls het omgekeerde het geval. Bij sommige stammen gaat dit zoover, dat in één of meer subcultures de groeiwijze niet meer te onderscheiden is van die van het humane type. De van den aanvang af hooge virulentie voor het konijn neemt echter hierbij in het geheel niet af, zoodat men hierdoor toch steeds den waren aard van het type kan vaststellen. Passage door konijnen heeft geen bepalenden invloed op de groeiwijze in de eene of andere richting. Een dysgonische stam kan na passage door een konijn dysgonisch blijven (2240), maar ook eugonisch worden (562). Een eugonisch geworden stam kan deze groeiwijze na konijnen passage behouden (1188), maar ook terugkeeren tot den dysgonischen vorm (2240).

Indien men voor het bepalen van het type van den tuberkelbacil niet van de dierproef gebruik maakt, moet men met deze sterke veranderingen in groeiwijze rekening houden.

In andere proeven is ons gebleken, dat, hoewel slechts in hooge uitzondering, ook de virulentie voor het konijn niet steeds een volkomen constante eigenschap is. Vooral bij weinig virulente stammen b.v. van lupus afkomstig, is het soms buitengewoon moeilijk het type vast te stellen. De groote variabiliteit in groeiwijze van het bovine type geeft dan bij de determinatie nog bijzondere moeilijkheden.

Samenvatting.

Van 43 tuberkelbacillen stammen van het bovine type, gekweekt op den voedingsbodem van Löwenstein, vertoonden 35 een verandering in groeiwijze, die tenslotte bij sommige stammen zoover door ging, dat het uiterlijk van het humane type ontstond.

De virulentie voor het konijn onderging hierbij geen verandering.

Passage door konijnen had geen beslissenden invloed op de groeiwijze van deze stammen.

Tot slot een woord van dank aan Mevr. J. Adriani—Blindenbach, wier toewijding dit onderzoek mogelijk maakte.

Verklaring foto's:

Foto I stam 2240 (schema II)

- a. op voedingsbodem van Löwenstein met glycerine vóór passage door konijn
- b. op voedingsbodem van Löwenstein zonder glycerine vóór passage door konijn
- c. op voedingsbodem van Löwenstein met glycerine na passage door konijn
- d. op voedingsbodem van Löwenstein zonder glycerine na passage door een konijn

Foto II stam 562 (schema IV)

- e. op voedingsbodem van Löwenstein met glycerine
- f. op voedingsbodem van Löwenstein zonder glycerine

Foto III

- g. eugonische bovine stam (112) op voedingsbodem van Löwenstein met glycerine
- h. eugonische humane stam op voedingsbodem van Löwenstein met glycerine

Foto IV stam 112 (schema I) groei op bouillon-agar

LITERATUUR:

- (1) Deutsche Mediz. Wochenschr. 1930, p. 1010.
 - (2) Acta Tuberculosea Scandinavica. 1934, p. 153.
 - (3) A system of bacteriology, deel 5, 1930.
 - (4) C. R. Soc. de Biol. 118, p. 304.
 - (5) C. R. Soc. de Biol. 118, p. 755.
 - (6) C. R. Soc. de Biol. 119, p. 725.
-

Stofwisselingsproeven met *C. Diphtheriae*. II¹⁾.

DOOR

Dr. A. TASMAN en Dr. A. C. BRANDWIJK.

In een vorige mededeeling (1) werden proeven beschreven, waarbij het doel was na te gaan, hoe snel de aan een bepaalde voedingsvloeistof toegevoegde glucose na de enting met een diphtheriecultuur verdween, zulks in samenhang met de verandering van den zuurgraad (p_H) en het verloop van de toxinevorming. Tevens werd betoogd, dat slechts een uitgebreid quantitatief onderzoek, *in verband met de toxinevorming*, zou kunnen leiden tot een beter inzicht in dit proces.

Fujita en *Kodama* (2) hebben langs manometrischen weg getracht een inzicht te krijgen in het verband tusschen gisting en ademhaling door diphtheriebacteriën. Hierbij treedt een duidelijk Pasteur-effect op. Ook bij overmaat zuurstof (aerobe glucoseontleding) treedt echter in sterke mate een anaerobe gisting op. Al hun proeven werden uitgevoerd met suspensies van diphtheriebacteriën, welke in hoofdzaak onderzocht werden in bicarbonaathoudende fosphaatbuffers, waarin dus een celvermeerdering practisch uitgesloten was. Bij enkele proeven werd tevens een, de celvermeerdering in de hand werkende, vloeistof (bouillon of synthetisch medium) toegevoegd, waardoor zoowel de ademing als de gisting in sterke mate toenamen (tot 100%). Als ontledingsproducten der glucose onder anaerobe voorwaarden werden kwalitatief aangetoond: mierenzuur, azijnzuur, melkzuur en barnsteenzuur. Alcohol, koolzuur en propionzuur werden door hen niet gevonden. Over de wijze, waarop de glucose in deze ontledingsproducten gesplitst wordt,

¹⁾ Voordracht, gehouden op de Vergadering van de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie te Amsterdam op 13 November 1937.

laten de genoemde auteurs zich niet uit. Evenmin wordt aan de toxinevorming aandacht geschonken.

In hetgeen hieronder volgt zal getracht worden een inzicht te verkrijgen in de wijze, waarop de glucose door de diphtheriebacteriën ontleed wordt, en wel onder omstandigheden, waarbij tevens toxine gevormd wordt, zij het dan ook *nadat* de glucose ontleed is (zie de eerste mededeeling).

Allereerst werd nagegaan, welke ontledingsproducten hierbij gevormd worden. Hiertoe werd een cultuurmedium bereid van de volgende samenstelling (*Pope* (3)):

MgSO ₄ .6 H ₂ O	0,2	gram
CaCl ₂ .6 H ₂ O	0,1	„
Na ₂ HPO ₄ .2 H ₂ O (Sörensen)	1,0	„
K ₂ HPO ₄	1,0	„
Difco Proteose pepton	20.—	„
Glucose p.a.	2,0	„
Gedestilleerd water	1000	cm.

Met 50% NaOH op pH = 8,0 gebracht en gesteriliseerd door filtratie door een Seitz E.K.-filter.

Deze cultuurvloeistof werd in hoeveelheden van 2 liter in de in de vorige mededeeling beschreven platte cultuurkolven gebracht. Deze werden na de enting gedurende 38—40 uur bij 35° C. bebroed en daarna geanalyseerd. De volgende stoffen werden als ontledingsproducten van de glucose aangetoond²⁾:

Aethylalcohol als jodoform.

Mierenzuur als cero-formiaat, door reductie van sublimaat tot calomel en volgens de reactie van *Hehner* (5).

Aziijnzuur als natrium-uranylacetaat.

Propionzuur als barium- en mercuropropionaat.

Melkzuur als cobalto-, cobalto-barium- en cobaltoloodlactaat en volgens de reactie van *Uffelmann*.

Barnsteenzuur als loodsuccinaat.

Nadat aldus de vorming van de bovenstaande ontledingsproducten kwalitatief aangetoond was, werd overgegaan tot een

²⁾ De microchemische reacties werden uitgevoerd door den Heer G. van Wijngaarden Hzn., wien wij ook te dezer plaatse gaarne onzen dank betuigen. Zie verder *Behrens-Kley* (4).

quantitatief onderzoek van de glucose-ontleding. De hiervoor noodige proeven werden als volgt ingericht. In een platte cultuurfkolf werd 2 l. van het bovenomschreven medium gebracht. De kolf was gesloten met een driemaal doorboorde rubberstop, waarin zich een vulbuis en een gas in- en uitvoerbuis bevonden. Na de enting werd gedurende 38-40 uur bij 35° C. bebroed, terwijl gedurende dien tijd een steriele, van CO₂ bevrijde luchtstroom in langzaam tempo over de cultuur geleid werd. De ontwijkende gassen passeerden drie waschfleschjes met 20% KOH. Met nadruk zij er hier reeds op gewezen, dat deze omstandigheden zeker niet de gunstigste zijn voor een *zuivere* bestudeering van de *vergisting* der glucose, daar de door de zuurstof teweeggebrachte ademhaling de vergisting terugdringt (*Fujita* en *Kodama*, l.c.).

Aangezien de diphtheriebacteriën anaeroob echter geen toxine vormen en wij juist alle proeven wenschten te nemen in zoo nauw mogelijken samenhang met de toxineproductie, zijn wij over dit bezwaar heengestapt. De kweekduur was, in verband met de in de eerste mededeeling beschreven proeven zóódanig gekozen, dat de toegevoegde glucose nog juist niet geheel verdwenen was, zoodat de kans op secundaire ontledingsreacties (oxydatie van de bij de *vergisting* gevormde producten) zoo klein mogelijk was.

Koolzuur werd zoowel vóór als na de proef bepaald in de gebruikte loog en in het cultuurmedium (*Tasman* en *Pot* (6), *Braak* (7)).

Aethylalcohol bepaalden wij volgens *Northrop* (8).

Mierenzuur, *Aziijnzuur* en *Propionzuur* werden bepaald als door *Tasman* (9) aangegeven.

Voor de bepaling van *Melkzuur* bezigden wij de methode van *Friedemann* en *Kendall* (10) (zie ook *Tasman* en *Pot* (6)).

Bij de bepaling van *Barnsteenzuur* ondervonden wij aanvankelijk groote moeilijkheden. Tenslotte werd de volgende techniek hiervoor toegepast (*Karström* (11)). Van het in water opgeloste aetherextract van het stoomresidu (melkzuur en barnsteenzuur bevattende) wordt 50 cm³ warm geneutraliseerd met bariet en daarna gefiltreerd en uitgewasschen. Het filtraat wordt na indampen behandeld met 96% alcohol, waardoor het grootste gedeelte van het bariumlactaat in oplossing gaat. Het residu wordt in een weinig water opgelost en 1 gram aardappel-

meel toegevoegd ³⁾ en op het waterbad verstijfseld. Deze stijfsel wordt met enkele druppels 50% zwavelzuur t.o.v. congopapier aangezuurd, met watervrij natriumsulfaat tot een vaste massa gemaakt en vervolgens ten tweede male met aether geëxtraheerd. Het extract wordt na verdamping van de aether in water opgelost, geneutraliseerd met verdunde loog en het barnsteen-zuur als zilverzout neergeslagen. Dit zilversuccinaat wordt afgefiltreerd en gedurende 24 uur in vacuum bij 37° C. gedroogd en gewogen.

Voor de *glucose*-bepalingen zij naar de eerste mededeeling verwezen.

De resultaten van een viertal proeven met twee verschillende „P.W. 8”-stammen zijn in de onderstaande tabellen 1 t/m 4 weergegeven.

TABEL 1. Glucose-ontleding met **Tomcsik**-stam. 38 uur bij 35° C.

Substantie	Gram	% C	Milli mols	Milli-mols per 100 milli-mols ontlede glucose	Milli-aequivalent „beschikbare waterstof”	% „beschikbare waterstof”
Substraat:						
Glucose toegevoegd . . .	4,02					
„ teruggevonden . . .	0,85					
„ ontleed	3,67	100	20,3	100	2400	100
Ontledingsproducten:						
Koolzuur	1,50	27,6	34,1	168	—	—
Aethylalcohol	0,127	4,5	2,8	13,8	166	6,9
Mierenzuur	0,492	8,7	10,7	52,6	105	4,4
Aziijnzuur	0,806	21,9	13,4	65,9	527	22,0
Propionzuur	0,917	30,3	12,7	62,5	875	36,9
Melkzuur	spoor	—	—	—	—	—
Barnsteenzuur	spoor	—	—	—	—	—
Totaal .		92,8				70,2

Propionzuur: Aziijnzuur = 0,95.

³⁾ Bij de tweede extractie kwam het meermalen voor, dat het barnsteenzuur uit het na aanzuren van het met natriumsulfaat tot een steenharde massa gemaakte indampresidu niet volledig teruggewonnen werd. Vandaar de door ons toegepaste toevoeging van zetmeel, waardoor in de hieruit verkregen stijfsel meer water gebonden werd en de extraheerende aether gemakkelijker het barnsteenzuur bereikte.

TABEL 2. Glucose-ontleding met **Tomcsik**-stam. 38 uur bij 35° C.

Substantie	Gram	% C	Milli-mols	Milli-mols per 100 milli-mols ontlede glucose	Milli- aequivalent „beschikbare waterstof”	% „beschikbare waterstof”
Substraat:						
Glucose toegevoegd . . .	4,02					
„ teruggevonden . . .	0,48					
„ ontleed	3,54	100	19,7	100	2400	100
Ontledingsproducten:						
Koolzuur	1,00	19,2	22,7	115	—	—
Aethylalcohol	spoor	—	—	—	—	—
Mierenzuur	0,532	9,8	11,6	59,2	118	4,5
Aziijnzuur	0,793	22,3	13,2	67,2	538	22,4
Propionzuur	1,06	49,1	14,4	73,4	1028	42,8
Melkzuur	spoor	—	—	—	—	—
Barnsteenzuur	spoor	—	—	—	—	—
Totaal		90,4				69,7

Propionzuur: Aziijnzuur = 1,16.

TABEL 3. Glucose-ontleding met **Bandoeng**-stam. 40 uur bij 35° C.

Substantie	Gram	% C	Milli-mols	Milli-mols per 100 milli-mols ontlede glucose	Milli- aequivalent „beschikbare waterstof”	% „beschikbare waterstof”
Substraat:						
Glucose toegevoegd . . .	4,20					
„ teruggevonden . . .	0,55					
„ ontleed	3,65	100	20,4	100	2400	100
Ontledingsproducten:						
Koolzuur	1,31	25,1	29,8	146	—	—
Aethylalcohol	0,019	1,0	0,4	2,0	24	1,0
Mierenzuur	0,469	8,6	10,2	50,0	100	4,2
Aziijnzuur	1,13	31,1	18,8	92,1	737	30,7
Propionzuur	0,172	5,9	2,3	11,3	158	6,6
Melkzuur	0,603	16,9	6,7	32,8	394	16,4
Barnsteenzuur	0,357	9,6	3,0	14,7	206	8,6
Totaal		98,2				67,5

Propionzuur: Aziijnzuur = 0,12.

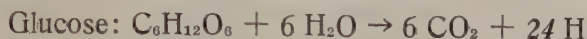
TABEL 4. Glucose-ontleding met **Bandoeng-stam**, 40 uur bij 35° C.

Substantie	Gram	% C	Milli-mols	Milli-mols per 100 milli-mols ontlede glucose	Milli- aequivalent „beschikbare waterstof”	% „beschikbare waterstof”
Substraat:						
Glucose toegevoegd . . .	4,20					
„ teruggevonden . . .	0,38					
„ ontleed	3,82	100	21,3	100	2400	100
Ontledingsproducten:						
Koolzuur	0,980	17,5	22,3	104,8	—	—
Aethylalcohol	0,014	0,5	0,3	1,5	18	0,8
Mierenzuur	0,457	7,8	9,9	48,5	97	4,0
Aziijnzuur	1,13	29,6	18,8	92,1	737	30,7
Propionzuur	0,207	6,6	2,8	13,7	192	8,0
Melkzuur	0,523	13,7	5,8	28,4	341	14,2
Barnsteenzuur	0,573	15,2	4,9	24,0	336	14,0
Totaal		90,9				71,7

Propionzuur: Aziijnzuur = 0,15.

De eerste vijf kolommen van deze tabellen behoeven geen nadere toelichting. Betreffende de zesde en zevende kolom diene het volgende. Indien de toegevoegde glucose geheel „vergist”, d.w.z. ontleedt via intermoleculaire oxydo-reductie-reacties en de zuurstof van de lucht dus geen rol speelt als waterstofacceptor, moet men in de eindproducten behalve de uit de glucose stammende koolstof (zie kolom 3 der tabellen) eveneens de totale hoeveelheid waterstof terugvinden. Daar echter verscheidene der bedoelde reacties plaats vinden onder opname en afgifte van een of meerdere moleculen water, kan men voor de waterstofbalans niet dezelfde eenvoudige berekening toepassen als voor de koolstofbalans het geval is. Door *Barker* (12) is hiervoor de volgende methode toegepast. Men denke zich een aantal reacties, waarbij de uitgangsstof glucose en de hieruit gevormde ontledingsproducten, zoo nodig onder opname van water intramoleculair volledig tot CO₂ gedehydrogeneerd worden en gaat na hoeveel atomen waterstof aldus per molecuul zouden vrij komen. Dit getal zou men de „waterstofwaarde” van het betreffende product kunnen noemen. Voor de

in ons geval in aanmerking komende stoffen worden deze waterstofwaarden als volgt berekend.



De milli-aequivalenten „beschikbare waterstof” van de zesde kolom worden dus berekend door de overeenkomstige waarden van de vijfde kolom met de hierboven aangegeven „waterstofwaarden” te vermenigvuldigen. In de laatste kolom zijn deze waarden procentueel berekend. Naarmate de gesommeerde waarde der cijfers van de laatste kolom in de tabellen dus sterker van 100 afwijkt, zal de zuurstof als waterstof-acceptor in de verschillende glucose-ontledingen zijn opgetreden.

Bij beschouwing van de bovenstaande tabellen valt op, dat de zuurstof van de lucht als waterstofacceptor inderdaad een niet te verwaarlozen rol gespeeld heeft. Terwijl de totalen der koolstofbalansen alleszins bevredigend zijn, blijkt de som der reductiebalans in alle gevallen slechts pl.m. 70% te bedragen. Deze waarde laat echter zeer wel de mogelijkheid open om een aantal oxydo-reductiereacties op te stellen, volgens welke het eigenlijke ontledingsproces der glucose verloopt.

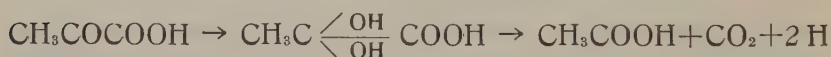
Bezien wij de balansen thans nader, dan blijkt allereerst, dat in alle onderzochte gevallen propionzuur onder de ontledingsproducten gevonden wordt. *Mej. de Wolff* (13) is de eerste geweest, die de vorming van propionzuur uit glucose door diphtheriebacteriën kwalitatief aantoonde. Quantitatieve ontledingsproeven zijn door haar evenwel niet verricht.

Opvallend is het verschillend gedrag der twee gebruikte stammen. De Tomcsik-stam vormt naast sporen melkzuur een t.o.v. aziijnzuur relatief groote hoeveelheid propionzuur, terwijl de Bandoeng-stam tamelijk groote hoeveelheden melkzuur vormt, maar hiernaast slechts geringe hoeveelheden propionzuur produceert.

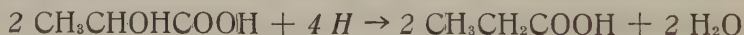
Wanneer wij nu trachten zullen eenig inzicht in het mechanisme der bovenbeschreven glucose-ontleding te verkrijgen, spreekt het vanzelf, dat wij ons oog richten op de vele onderzoeken betreffende de glucosevergisting door de eigenlijke propionzuurbacteriën, waarbij genoemd zuur gewoonlijk ook quantitatief als het meest belangrijke product op den voorgrond treedt. En zulks des te eerder, omdat door *Kluyver* en *Van Niel* (14) in hun pogingen tot hernieuwde classificatie der bacteriën de propionzuurbacteriën in dezelfde groep („tribus”) ondergebracht zijn als de diphtheriebacteriën (p. 401, VIII. Tribe *Corynebacteriae*).

Over het mechanisme der propionzuurgisting is in 1928 een uitvoerig onderzoek van *Van Niel* (15) verschenen (zie ook *Kluyver* (16)), waarin ook de tot op dien tijd verschenen literatuur besproken wordt. *Van Niel* gaat uit van de lactaatvergisting door de verschillende propionzuurstammen en stelt zich deze ontleding als een gekoppelde oxydo-reductie voor.

Oxydatiereactie:

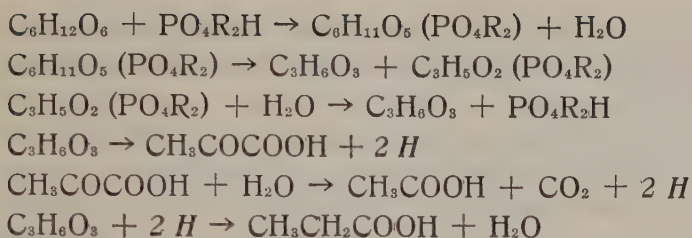


Reductiereactie:



Alcohol en mierenzuur worden bij deze vergistingen niet gevormd. Het barnsteenzuur, dat bij sommige vergistingen optrad, wordt door hem als komende uit de pepton beschouwd.

Betreffende de glucosevergisting neemt *Van Niel* aan, dat een phosphoryleering van het glucosemolecuul aan de eigenlijke vergisting voorafgaat. Als gevolg van deze phosphoryleering wordt het glucosemolecuul daarna in twee C_3 -verbindingen gesplitst, waarvoor *Van Niel* (in 1928) o.a. methylglyoxaal aannam. Dit methylglyoxaal zou dan òf via melkzuur òf direct aan de boven medegedeelde oxydoreducties onderhevig zijn, zoodat volgens hem tenslotte het volgende complex van opeenvolgende en onderling samenhangende reacties van glucose tot de drie bovengenoemde eindproducten, koolzuur, azijnzuur en propionzuur zou leiden.



De verhouding tusschen de gevormde hoeveelheden propion- en azijnzuur is, in bevredigende overeenstemming met dit schema, dan ook voor de lactaatvergistingen constant 1,8. Voor de glucosevergisting is deze verhouding echter sterk wisselend (1,0—4,2), hetgeen *Van Niel* verklaart, doordat hij aannemelijk kon maken, dat onder de door hem gekozen voorwaarden, sommige peptonbestanddeelen, welke in het medium aanwezig waren, als waterstofdonatoren optreden, onder gelijktijdige vorming van propionzuur als hydrogenatieproduct.

Deze eenvoudige voorstellingswijze van *Van Niel* is echter door latere onderzoekers geenszins algemeen aanvaard.

Hitchner (17) neemt de vorming van de vluchtige zuren uit barnsteenzuur aan.

Wood en *Werkman* (18) bewijzen in 1934, dat onder bepaalde voorwaarden pyrodruivenzuur wordt gevormd en bevestigen hiermede tot op zekere hoogte *Van Niel's* schema. In hetzelfde jaar wordt door hen (19) propionaldehyde bij de vergisting van melkzuur aangetoond. In een aantal latere publicaties komen deze schrijvers van de voorstellingswijze van *Van Niel* terug en nemen de mogelijkheid aan van een ontstaan van het propionzuur uit barnsteenzuur (splitsing in CO_2 en propionzuur) (*Wood, Stone* en *Werkman* (20) en *Erb, Wood, Stone* en *Werkman* (21)).

Wood, Stone en *Werkman* (22) maakten analyses van propionzuurgistingen, niet alleen aan het eind van de vergisting, maar tevens gedurende dit proces en verkregen zodoende a.h.w. „doorsneden” van het geheele proces, waaruit zij concludeerden, dat het propionzuur behalve uit melkzuur, waarschijnlijk uit barnsteenzuur gevormd zou worden. Genoemde schrijvers (23, 24) toonden tevens de vorming van phosphorglycerinezuur als tusschenproduct aan. Tenslotte zij nog genoemd een onderzoek van de meer genoemde auteurs (25), waarin de aerobe glucose-ontleding behandeld wordt. Ook hier wordt

azijnzuur in veel grootere hoeveelheden dan propionzuur gevormd. Nogmaals wordt op de vorming van propionzuur uit barnsteenzuur gewezen.

Ook betreffende de vormingswijze van barnsteenzuur bestaat geen eenstemmigheid tusschen de verschillende onderzoekers. *Van Niel* nam, zooals reeds medegedeeld werd, aan, dat dit zuur, buiten de eigenlijke glucosevergisting om, uit de amino-zuren van de aanwezige pepton gevormd zou worden, zulks in tegenstelling met *Virtanen* (zie uitvoerige referentie bij *Van Niel*), die het barnsteenzuur ontstaan denkt door de splitsing van de 6 C-atomen bevattende keten van het glucosemolecuul in een met twee en een met vier C-atomen. Dit laatste is volgens *Scheffer* (26), *Kluyver* loc. cit., *Tasman* en *Pot* (27) ook het geval bij de glucosevergistingen door bacteriën van de *Coli-aerogenes*-groep. *Werkman* en medewerkers (28) nemen echter aan, dat het barnsteenzuur gevormd wordt door condensatie en daarop volgende dehydrogenatie van twee moleculen azijnzuur.

Gezien de weinige eenstemmigheid betreffende de glucosevergisting door propionzuurbacteriën zal het dus niet eenvoudig zijn een beeld te ontwerpen van hetgeen gebeurt tijdens de afbraak van het glucosemolecuul door diphtheriebacteriën.

In de eerste plaats staan we voor de keuze om het propionzuur uit een C_3 -verbinding (b.v. melkzuur of methylglyoxaalhydraat) te doen ontstaan of aan te nemen, dat het propionzuur ook hier uit barnsteenzuur gevormd wordt.

Wij verrichten daartoe de volgende proeven. Aan twee porties van 2 l. van het bovenomschreven medium van *Pope* (echter zonder glucose) werd toegevoegd resp. 0,5% barnsteenzuur en 0,5% melkzuur en na enting met een diphtheriecultuur, gedurende 46 uur bij 35° C. gecultiveerd. Na dien tijd was in het eerstgenoemde substraat géén propionzuur aantoonbaar, terwijl de reacties op propionzuur en pyrodruivenzuur (microchemisch als phenylhydrazon in het tweede cultuurmedium wél positief uitvielen. Vervolgens werd een quantitative melkzuurontleding uitgevoerd (op overeenkomstige wijze als de glucoseontleding), waarvan de resultaten in onderstaande tabel 5 verzameld zijn.

Opvallend is hierbij de geringe hoeveelheid melkzuur, die ontleed wordt en het sterk aerobe karakter van deze ontleding.

T A B E L 5. Melkzuur-ontleding met **Tomcsik**-stam. 72 uur bij 35° C.

Substantie	Gram	% C	Milli-mols	Milli-mols per 100 milli-mols ontleed melkzuur	Milli- aequivalent „beschikbare waterstof”	% „beschikbare waterstof”
Substraat:						
Melkzuur toegevoegd . .	4,00					
„ teruggevonden .	1,26					
„ ontleed	2,74	100	30,4	100	1200	100
Ontledingsproducten:						
Koolzuur	3,26	80,8	74,1	245	—	—
Mierenzuur	0,238	5,6	5,1	16,8	34	2,8
Aziijnzuur	0,185	6,7	3,1	10,2	82	6,8
Propionzuur	0,068	3,0	0,9	3,0	42	3,5
Totaal . .		96,1				13,1

Propionzuur: Aziijnzuur = 0,20.

Tenslotte zij nog medegedeeld, dat in een „blanco” kolf, waarin zich alleen de minerale zouten en pepton in oplossing bevonden, na bebroeding met een diphtheriecultuur geen propionzuur aantoonbaar was. De vorming van genoemd zuur uit de peptonen mag dus in ons geval als zijnde zeer onwaarschijnlijk verworpen worden.

Uit een en ander, in samenhang met de bij de oorspronkelijke glucose-ontledingen verkregen resultaten, meenen wij te mogen concludeeren, dat het propionzuur bij de aerobe glucose-ontleding door *C. Diphtheriae* *niet* uit barnsteenzuur doch naar alle waarschijnlijkheid uit een C₃-product (samenhangende met melkzuur) gevormd wordt. Dit is dan op te vatten als een reductiereactie, waaraan derhalve als oxydatiereactie gekoppeld moet zijn de vorming van pyrodruivenzuur uit de C₃-verbinding en vervolgens de dehydrogenatie van pyrodruivenzuur tot aziijnzuur en koolzuur.

Een tweede belangrijke vraag is die naar het ontstaan van barnsteenzuur bij de glucosevergistingen. Ook hier staan we weer voor de keuze tusschen verschillende mogelijkheden, nl. de meergenoemde C₂-C₄-splitsing van het glucosemolecuul, een condensatie $2\text{ C}_2 \rightarrow \text{C}_4$ of de vorming van barnsteenzuur uit de peptonen van het gebruikte cultuurmedium. Uit een diphtherie-

kweek, waarin als koolstofvoedsel naast de peptonen 0,5% azijnzuur toegevoegd was, kon echter kwalitatief geen barnsteen-zuur aangetoond worden, zoodat de twee laatstgenoemde ontstaanswijzen buiten beschouwing gelaten mogen worden. Bovendien zij opgemerkt, dat in de proeven, waarbij dit zuur quantitatief bepaald kon worden (Tabel 3 en 4), de koolstof- en waterstofbalansen geheel in overeenstemming zijn met deze voorstellingswijze.

De geringe hoeveelheden alcohol kunnen ongedwongen hun verklaring vinden in een ontstaan naast barnsteenzuur via de meergenoemde C₂-C₄-splitsing. Dat alcohol onder aerobe omstandigheden door diphtheriebacteriën gedeeltelijk tot azijnzuur geoxydeerd wordt, kon door ons op de bovenbeschreven wijze kwalitatief aangetoond worden.

Tenslotte rest dan nog de vorming van het steeds optredende mierenzuur. Door *Neuberg* (29) is reeds in 1914 aangetoond, dat door colibacteriën onder aerobe voorwaarden uit pyrodruivenzuur azijnzuur en mierenzuur ontstaan volgens de vergelijking:



Ook *Marjory Stephenson* (30) bespreekt in 1937 deze reactie door colibacteriën, zoodat ook wij deze ontstaanswijze in ons geval als de meest waarschijnlijke aanvaarden.

Dat het mierenzuur bij de vergisting van melkzuur niet als een toevallig ontledingsproduct tijdens de analyse van het substraat gevormd wordt (stoomdestillatie in zuur milieu), werd door ons als volgt aangetoond.

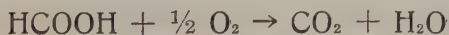
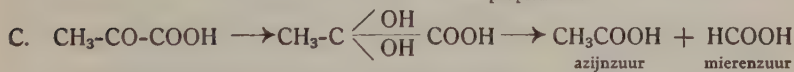
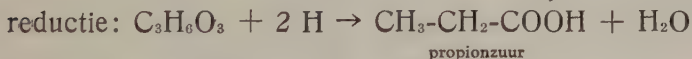
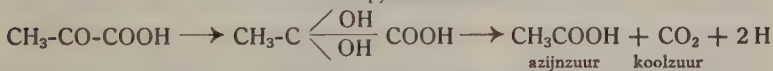
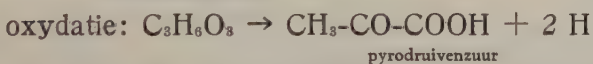
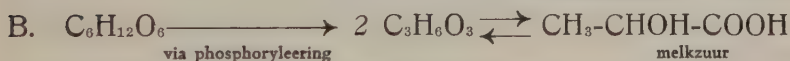
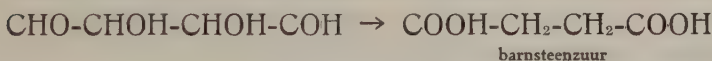
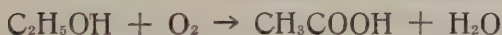
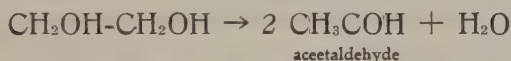
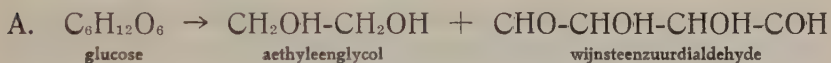
2 l. ongeënt cultuurmedium, waarin zich 10 gram melkzuur bevond, leverde op de gebruikelijke wijze geanalyseerd een hoeveelheid calomel, welke overeenkwam met 0,019 gram mierenzuur. Voor balans no. 5, waarbij na de proef 1,26 gram ontteld melkzuur teruggevonden werd, laat zich dus de hoeveelheid „mierenzuur” tijdens de analyse ontstaan, berekenen op $1,26/10 \times 0,019 = 0,0024$ gram. Dit is 1% van de in werkelijkheid geconstateerde hoeveelheid, zoodat de mierenzuurvorming, ook bij de glucoseontledingen, als een realiteit beschouwd moet worden.

Dat uit mierenzuur onder aerobe voorwaarden CO₂ kan ontstaan, werd tevens door ons quantitatief aangetoond (uit

2,00 gram mierenzuur in 2 l. substraat werd in 48 uur 1,25 gram CO_2 gevormd).

De vorming van barnsteenzuur zou volgens *Kluyver, Scheffer, Braak* e.a. niet door een voorafgaande phosphoryleering van het glucosemolecuul ingeleid worden. Dit is echter wel het geval voor de splitsing van het glucosemolecuul in twee C_3 -verbindingen. Ook in ons geval zal zeker aan deze ontleding van de glucose een phosphoryleering voorafgaan. Welke phosphorzure esters daarbij optreden, resp. of ook hier phosphoglycerinezuur gevormd wordt, valt momenteel niet te overzien.

Wij willen, op grond van de voorafgaande uiteenzettingen, trachten hieronder een beeld te geven van de reacties, welke naar alle waarschijnlijkheid verlopen bij de aerobe suiker-ontleding door diphtheriebacteriën.



Wij willen niet nalaten, er op te wijzen, dat met de bovenstaande formuleringen geenszins bedoeld is een als vaststaand te aanvaarden schema te geven, doch slechts getracht is het momenteel aanwezige feitenmateriaal door een aantal onderling samenhangende reactievergelijkingen weer te geven.

Nogmaals zij er de nadruk op gelegd, dat wij hier te maken hebben met een door zuurstof verstoorde glucosevergisting, welke dus geen zuiver beeld te zien geeft van datgene, wat onder strikt anaerobe voorwaarden verloopt.

In dit verband moge nog genoemd worden een recent onderzoek van *Fromageot* en *Chaix* (31). Genoemde onderzoekers toonden aan, dat in een atmosfeer van 70% CO₂ en 30% O₂ de eigenlijke „vergisting” van glucose door propionzuurbacteriën (*P. pentosaceum*) voor 70% teruggedrongen wordt. Hetzelfde, hoewel niet in die mate, geldt voor de aerobe vergisting van melkzuur door deze bacteriestam. De vergisting van pyrodruivenzuur wordt daarentegen door de tegenwoordigheid van zuurstof niet beïnvloed.

Samenvatting.

In deze mededeling werd de glucose-ontleding door diphtheriebacteriën onder aerobe voorwaarden aan een nader kwalitatief en kwantitatief onderzoek onderworpen.

Onder de ontledingsproducten werd in alle onderzochte gevallen propionzuur gevonden.

Aan de hand van de verkregen resultaten werd aannemelijk gemaakt, dat de „vergisting” van de glucose (welke „vergisting” door de aanwezige zuurstof gestoord wordt, waardoor er een duidelijk Pasteur-effect optreedt), waarschijnlijk verloopt overeenkomstig de glucosevergisting door de eigenlijke propionzuurbacteriën.

Deze ontleding komt dan in hoofdzaak op het volgende neer. Een deel van de glucose wordt, zonder voorafgaande phosphoryleering gesplitst in een keten met twee en een met vier C-atomen, uit welke splitsing tenslotte azijnzuur, alcohol en barnsteenzuur zullen ontstaan. Een ander deel van de glucose wordt via een voorafgaande phosphoryleering (waarvan het karakter momenteel niet te overzien valt) gesplitst in twee C₃-verbindingen. Door opeenvolgende intermoleculaire oxydo-reducties ontstaan hieruit tenslotte melkzuur, azijnzuur, propionzuur, mierenzuur en koolzuur.

Aangetoond werd, dat het ingrijpen van de zuurstof in de bovengenoemde ontledingsprocessen o.m. hierin bestaat, dat mierenzuur tot koolzuur en water en alcohol tot azijnzuur ge-oxydeerd wordt.

Met nadruk zij vermeld, dat de in de bovenstaande verhandeling genoemde voorstelling van de glucose-ontleding door diphtheriebacteriën niet beschouwd moet worden als een als vaststaand te aanvaarden schema. Het is zeer wel denkbaar, dat een voortgezet onderzoek van de glucosevergisting o.a. onder strikt anaerobe omstandigheden, op sommige punten tot andere beschouwingen zal leiden.

Tenslotte willen wij niet nalaten *Prof. Dr. A. J. Kluyver* ook van deze plaats dank te zeggen voor de belangstelling en de opbouwende critiek, welke wij gedurende dit onderzoek van hem mochten ontvangen.

LITERATUUR:

- (1) *A. Tasman* en *A. C. Brandwijk*, Biochem. J. **30**, 1756 (1936); Leeuwenhoek **3**, 134 (1936).
- (2) *A. Fujita* en *T. Kodama*, Biochem. Z. **269**, 367 (1934); **271**, 185 (1934).
- (3) *C. G. Pope*, Brit. J. Exp. Pathol. **13**, 207 (1932).
- (4) *Behrens-Kley*, Organische mikrochemische Analyse; Voss, Leipzig (1922).
- (5) *Hehner*, Analyst, **21**, 94 (1896).
- (6) *A. Tasman* en *A. W. Pot*, Biochem. Z. **270**, 349 (1934); Leeuwenhoek **1**, 88 (1934).
- (7) *H. R. Braak*, Diss. Delft (1928).
- (8) *J. H. Northrop*, J. Biol. Chem. **39**, 1 (1919).
- (9) *A. Tasman*, Chem. Weekblad **33**, 574 (1936).
- (10) *Th. E. Friedemann* en *A. J. Kendall*, J. Biol. Chem. **82**, 23 (1929).
- (11) *H. Karström*, Diss. Helsingfors (1930).
- (12) *H. A. Barker*, Proc. Kon. Akad. Wetenschappen, Amsterdam **39**, 674 (1936).
- (13) *H. H. de Wolff*, Diss. Utrecht (1927).
- (14) *A. J. Kluyver* en *C. B. van Niel*, Zentr. Bakt. II Abt. **94**, 369 (1936).
- (15) *C. B. van Niel*, Diss. Delft (1928).
- (16) *A. J. Kluyver*, The Chemical Activities of Microorganisms. Univ. London Press. (1931) p. 63.
- (17) *E. R. Hitchner*, J. Bact. **23**, 40 (1932); **28**, 473 (1934).
- (18) *H. G. Wood* en *C. H. Werkman*, Biochem. J. **28**, 745 (1934).
- (19) *H. G. Wood* en *C. H. Werkman*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **31**, 938 (1934).
- (20) *H. G. Wood*, *R. W. Stone* en *C. H. Werkman*, J. Bact. **29**, 84 (1935).
- (21) *C. Erb*, *H. G. Wood*, *R. W. Stone* en *C. H. Werkman*, J. Biol. Chem. **29**, 85 (1935).
- (22) *H. G. Wood*, *R. W. Stone* en *C. H. Werkman*, Biochem. J. **31**, 349 (1937).

- (23) *R. W. Stone* en *C. H. Werkman*, Iowa State Coll. J. Science **10**, 341 (1936).
 - (24) *R. W. Stone*, *C. Erb* en *C. H. Werkman*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **33**, 483 (1936).
 - (25) *C. Erb*, *H. G. Wood* en *C. H. Werkman*, J. Bact. **31**, 595 (1936).
 - (26) *M. A. Scheffer*, Diss. Delft (1928).
 - (27) *A. Tasman* en *A. W. Pot*, Biochem. Z. **270**, 349 (1934); Leeuwenhoek **1**, 88 (1934); *A. Tasman*, Biochem. J. **29**, 2246 (1935); Leeuwenhoek **2**, 358 (1935).
 - (28) *H. G. Wood* en *C. H. Werkman*, Biochem. J. **30**, 618 (1936).
 - (29) *C. Neuberg*, Biochem. Z. **67**, 90 (1914).
 - (30) *M. Stephenson*, Ergebn. Enzymforschung **6**, 139 (1937).
 - (31) *C. Fromageot* en *P. Chaix*, Enzymologia **3**, 288 (1937).
-

De gedragingen van *Azotobacter* onder abnormale voedingscondities en radiumbestraling ¹⁾

DOOR

DR L. E. DEN DOOREN DE JONG.

De beschouwingen van *Prof. van Loghem* in zijn laatste voordracht voor deze Vereeniging: „Over Bacterie-verandering als normale en ziekelijke functie” (1) zijn mij aanleiding geweest een nader onderzoek in te stellen naar de gedragingen van *Azotobacter* en te trachten zijn terminologie toe te passen op de door mij bij deze bacterie geconstateerde verschijnselen. Ik wil hier in het midden laten of de door *Prof. van Loghem* gegeven indeeling als definitief moet worden aanvaard. Voorloopig zal ik haar hier toch gebruiken.

Azotobacter is juist als studie-object gebruikt, daar uit talrijke onderzoekingen is gebleken, dat deze bacterie, welke *Löhnis* heeft verleid tot het schrijven van zijn veel becritiseerde Life-history, een veelvormigheid kan vertoonen, die zijn weerga in de bacteriologie niet vindt.

Door ophooping van tuingrond bij 30°C. in leidingwater met 2% glucose, 2% krijt, 0,1% K_2HPO_4 en 0,0025% Na-molybdaat werden 6 stammen verkregen genummerd 1011, 1012, 1399, 1400, 1401 en 1402.

De reinheid der verkregen stammen werd door uitstrijken op 1% peptonagar gecontroleerd.

Op leidingwateragar met 2% glucose, 2% krijt en 0,1% K_2HPO_4 (in het vervolg glucose-krijt-agar te noemen) vormden

¹⁾ Voordracht op 13 November 1937 te Amsterdam gehouden voor de Ned. Ver. voor Microbiologie.

deze stammen bruine, meer of minder rimpelige of slijmige koloniën. Stam 1400 onderscheidde zich van de andere door zijn bijzondere slijmigheid en gele kleur van de kultuur.

Het bleek dat *Azotobacter* ook nog bij 35°C. kon worden opgehoopt, maar niet meer bij 40°C.

Volgens de onderzoeken van *Löhnis* c.s. (2) zou *Azotobacter* een zeer gecompliceerde levenscyclus bezitten. Over de bijzonderheden van zijn werk kan hier niet worden uitgeweid. Zijn phantastische beschouwingen hebben veel critiek opgewekt, korten tijd geleden ook van de zijde van *Winogradsky* (3) en van *Lewis* (4). Wanneer wij afzien van de verontreinigingen, waarmee hij heeft gewerkt, is het een feit, dat *Azotobacter* in reïncultuur vele van de gestalten kan aannemen, die *Löhnis* en andere onderzoekers in hun verhandelingen hebben beschreven en afgebeeld (zie daarvoor o.a. de publicatie van *Prazmowski* (5)). De meesten der hedendaagsche microbiologen beschouwen deze monstrositeiten als degeneratieproducten welke of dood zijn of op verse voedingsbodems gebracht weer tot normale cellen uitgroeien.

De vraag dringt zich evenwel op of de waargenomen teratologische groeivormen zich niet kunnen stabiliseeren, zoodat zij in reïncultuur kunnen worden verkregen. Daartoe zou men de verschillende stammen in zeer abnormale levenscondities kunnen brengen, veel afwijkender dan ooit in normale culturen optreden.

In de eerste plaats op vaste voedingsbodems welke verschillende stikstofhoudende stoffen bevatten. Daartoe werden de 6 stammen op glucose-krijtplaten uitgestreken waaraan stijgende hoeveelheden vleeschwater, serum en ascitesvocht werden toegevoegd. Het bleek, dat zij zich hierop uitstekend konden ontwikkelen. Vervolgens werden voedingsbodems gebruikt, welke geen koolhydraat (glucose) bevatten n.l. 1, 2, 3, 4 en 5% pepton-agarplaten, waarvan de pepton van verschillende herkomst was. Het bleek, dat de stammen 3% pepton konden verdragen, maar ook niet meer en daarop langer dan een maand konden blijven leven. Nog betere groei trad in op bouillonagar, evenwel bleken de stammen daarop reeds na 14 dagen af te sterven.

Wanneer aan de glucose-krijtplaten 0,1% KNO_3 of 0,1% Am_2SO_4 of 0,1% van de meest verschillende aminozuren werd

toegevoegd, bleken KNO_3 , Am_2SO_4 en vele der aminozuren in genoemde concentratie zeer goede groei mogelijk te maken, enkele aminozuren belemmerden deze evenwel bijv. amidoguanidine sulfaat reeds in een concentratie van 0,03%.

Daarop werden KNO_3 , Am_2SO_4 , asparagine en α -alanine in hogere concentratie toegevoegd. Het bleek hierbij, dat KNO_3 soms tot 2-3%, meestal tot 0,5% werd verdragen, Am_2SO_4 werd over het algemeen zelfs tot 1,5% verdragen, asparagine tot meer dan 2%, α -alanine slechts tot 0,2-0,5%.

Wanneer deze culturen gemicroscopeerd werden, bleken zij een afwijkende gedaante te bezitten.

Afb. 1 toont *Azotobacter* 1011 op de normale glucose-krijt-agar. Afb. 2 dezelfde stam op genoemden voedingsbodem, waaraan 2% KNO_3 is toegevoegd. Men ziet dat een sterke volumetoename tot stand is gekomen. Stam 1012 nam daarentegen op een nitraathoudende voedingsbodem een draadvormige gestalte aan, terwijl dezelfde stam 1012 sterk gezwollen was op voedingsbodems met 1% asparagine en 0,5% α -alanine. Hoe vreemd de celgedaante dezer culturen ook was, wanneer zij op de normale stikstofvrije glucose-krijt-agar werden uitgestreken namen zij practisch steeds weer de oorspronkelijke kleine coccus-gestalte aan. Volgens de nomenclatuur van *van Loghem* heeft men dus met adaptaten te doen.

Wanneer aan de stikstofvrije glucose-krijt-platen een hoger percentage glucose werd toegevoegd, bleek deze nog tot 15 à 20% groei mogelijk te maken. Glycerine in plaats van glucose remde echter reeds de groei bij 2%.

Verder werd nagegaan tot welke concentratie „neutrale” substanties, aan gewone glucose-krijt-platen toegevoegd, konden worden verdragen. Hierbij bleek: NaCl tot 2%, LiCl_2 tot 0,5 à 1,25%, FeCl_3 tot meer dan 0,75%, CuSO_4 slechts tot 0,005%, Na-taurocholaat tot 2%, gentiaanviolet tot 0,01%. Ook op deze laatste voedingsbodems was de celgedaante in meerdere gevallen sterk afwijkend. Toch bleek men ook hier weer met adaptaten te doen te hebben.

Hoewel het aan meerdere onderzoekers reeds was gebleken (o.a. *Dean Burk* en *Lineweaver* (6)) dat *Azotobacter* nitraten, ammoniumzouten, aminozuren boven gasvormige stikstof verkiest, werd getracht op een andere wijze dan tot heden het geval

was, dit aan te toonen. Daartoe werden de verschillende stammen van *Azotobacter* op glucose-krijt-platen met resp. 0,1% KNO_3 , Am_2SO_4 , asparagine, α -alanine en tyrosine afgestreken. Deze platen werden in zuivere stikstofvrije zuurstof bij 30°C. bebroed. Het bleek na een week, dat op de platen slechts hier en daar enkele koloniën tot ontwikkeling waren gekomen. De meeste kiemen konden dus de hoogere zuurstof-concentratie niet verdragen, enkele konden zich daaraan aanpassen. Daardoor kon toch worden bewezen, dat *Azotobacter* in staat is gebonden stikstof bij afwezigheid van gasvormige stikstof te assimileeren.

Wanneer de koloniën werden gemicroscopeerd, bleken zij uit vergroote cellen te bestaan; zoo gaf stam 1011 op glucose-krijt-agar met 0,1% tyrosine fraaie groote sarcina-cellen te zien. Uitgestreken op eenzelfde voedingsbodem maar bebroed aan de lucht, namen deze cellen weer hun oorspronkelijke gedaante aan. Ook hier had men dus met adaptaten te doen.

Terwijl tot nu toe de gedragingen van *Azotobacter* uitsluitend op vaste voedingsbodems waren onderzocht, werden de 6 stammen nu in verschillende vloeibare voedingsmilieu's (1% peptonwater, vleeschbouillon, 1% peptonwater met 2% glucose, 1% vleeschbouillon met 2% glucose, enz.) bij 30°C. gecultiveerd en van daar uit na 1, 2, 3 en meer weken op krijt-glucose-platen uitgestreken.

Reeds op het uiterlijk der verkregen koloniën afgaande kreeg men den indruk, dat de wijze van variatie een andere was, dan die op de vaste voedingsbodems. Het bleek dat de uitstrijken uit de vloeibare culturen dikwijls een uiterst gevarieerde en merkwaardige koloniënflora te zien gaven. Groote platte koloniën tot 2 cm. $\varnothing$, kleine hoge koloniën als torentjes, gladde en ook rimpelige „bloemkool”-koloniën, droge en slijmige zwarte, bruine, beige, gele en kleurlooze koloniën, enz.

De merkwaardigste variatie gaf stam 1401, die naast de eerder genoemde gladde beige koloniën, ook kleine glazige zuurvormende koloniën opleverde. In bouillon (zonder glucose) bleek bij sommige stammen na een week afsterving te hebben plaats gevonden. Het was opvallend, dat van de 6 stammen er een onder deze condities weigerde te varieeren en wel stam 1400.

Deze proefnemingen waren mij aanleiding de variaties dezer stammen nog eens onder meer voor de hand liggende condities

te onderzoeken en wel in leidingwater 2% krijt, 2% glucose, 0,1% K_2HPO_4 dus zonder gebonden stikstof.

Wanneer na de genoemde tijdsafstanden op glucose-krijt-platen werd uitgestreken, bleek daarop een veel minder gevarieerde koloniënflora te verschijnen; voornamelijk slijmige naast droge koloniën, dus een soort S- en R-variatie. Tevens bleek, dat stam 1402, die bij de voorafgaande proefnemingen zich zeer variabel had getoond nu stabiel bleek, terwijl daarentegen stam 1400 thans zeer labiel was en nu talrijke meer of minder droge varianten had opgeleverd.

Terwijl tot nu toe de variatieverschijnselen steeds bij 30°C. waren bestudeerd, werden de stikstofhoudende cultuur-vloeistoffen nu eens bij 37°C. bebroed. Bij uitstrijken op glucose-krijt-agar verschenen alweer talrijke gevarieerde koloniën, (stam 1399 leverde bijv. „maankrater”-koloniën op!). Wanneer evenwel bij 37°C. in leidingwater glucose-krijt-medium werd bebroed, bleek dat — hoe zwaar ook geënt — 5 van de 6 stammen bij die temperatuur weigerden te groeien. Uitsluitend stam 1012 kon tot ontwikkeling komen en leverde bij uitstrijk lichtbruine slijmige en zwarte droge koloniën op, terwijl in peptonwater met 2% glucose, hoe zwak ook geënt, alle 6 stammen bij 37°C. tot ontwikkeling kwamen. Onder deze afwijkende voedingscondities bleek dus het groei-optimum aanmerkelijk verhoogd. Zooals ook uit het hieronder-volgende zal blijken zou men de verschijnselen, welke in stikstofhoudende milieu's optraden met pathologische variatie kunnen aanduiden.

Bij de proefnemingen op vaste voedingsbodems, enz. leverde de uitstrijk op de normale glucose-krijt-platen practisch steeds koloniën op, welke uit de normale cellen waren opgebouwd. De tijdelijke veranderingen waren dus van adaptatieven aard. Geheel anders was het met de celgedaante van de koloniën verkregen op glucose-krijt-platen, waarop de inhoud van de vloeibare culturen was uitgestreken. Hier bleken de bij deze culturen ingetreden veranderingen van blijvenden aard. In morphologisch opzicht zouden dus volgens de nomenclatuur van *van Loghem* mutilaten zijn ontstaan. Het merkwaardigste bleken ook nu weer de veranderingen, welke de cellen van stam 1401 hadden ondergaan.

Zoo leverde stam 1011, nadat deze gedurende 3-6 weken

bij 30° C. in 1 % peptonwater was bebroed, enkele gladde koloniën op, welke uit draadvormige cellen bestonden. Dezelfde stam gedurende dienzelfden tijd bij 37° C. in 1 % peptonwater met 2 % glucose bebroed, leverde zwarte koloniën op, waarvan de cellen groote gelijkenis bezaten met de sarcinen van het groenwier *chlorella*. Zoo zouden er nog vele voorbeelden te geven zijn.

Afb. 3 geeft de cellen van een beige kolonie van stam 1401 weer, nadat deze gedurende 3 weken bij 30° C. in 1 % peptonwater of bouillon met 2 % glucose was bebroed; reusachtige cellen waarvan de inhoud honderden malen grooter is dan van de oorspronkelijke 1401-stam. De laatste zal in het vervolg met 1401N (Normaal) worden aangeduid, terwijl de beschreven reuzenvorm 1401a zal worden genoemd. De genoemde beige koloniën kunnen ook uit sterk gerekte cellen zijn opgebouwd, waarvan de lengte tientallen malen die van 1401N overtreft. Soms zijn de ronde reuzencellen door enorme slijmkapsels omgeven, deze worden door 1401b aangeduid. Deze cellen maken den indruk aan lytische invloeden te zijn onderworpen, zoodat het niet onwaarschijnlijk is, dat met behulp van deze varianten, voorloopig met mutilaten aan te duiden, nog eens bacteriophagie zal kunnen worden aangetoond, welk verschijnsel, zooals bekend is, nog niet bij *Azotobacter* is kunnen worden gedemonstreerd. De merkwaardigste verandering die stam 1401 ondergaat zijn de zuurvormende cellen, welke (hoewel moeilijk) na 4 weken bebroeden in 1 % peptonwater met 2 % glucose ontstaan. Afb. 4 laat deze variant, aan te duiden met 1401c, zien. Zooals men ziet bestaat deze uit reusachtige bollen waarin zich soms vacuolen bevinden. Het merkwaardigste is wel, dat deze 1401c geen stikstof meer kan binden, zoodat deze slechts kleine koloniën op glucose-krijt-agar kan vormen en daarop op den duur geheel ten gronde zou gaan²⁾ als niet enkele der koloniën het vermogen tot stikstofbinding herkregeen en dan tot koloniën van normale afmetingen uitgroeiden. De cellen krijgen dan normale afmetingen zoodat het beter is dergelijke varianten, die naast mutilaten tegelijkertijd atropheonten en gedegeneranten zijn, tot de fixaten te rekenen. Het is misschien wel überhaupt de

²⁾ Wanneer men aan de glucose-krijt-platen 0,1 % van een goed assimileerbare stikstofverbinding toevoegt, kan men 1401c tot behoorlijke kolonien uit laten groeien.

vraag of er in de bacteriologie wel echte mutilaten bestaan daar men, als men kennis heeft van de condities, waarschijnlijk elk mutilaat, atropheont, enz. kan laten terugslaan.

Zoo is 1401c in 1% peptonwater met 2% glucose stabiel maar slaat in leidingwater met 2% glucose, 2% krijt en 0,1% K_2HPO_4 ten deele tot 1401N terug. In laatstgenoemd medium is 1401a stabiel maar is zeer variabel in 1% peptonwater met 2% glucose, waarin 1401a tot de N-toestand terugslaat.

Volgens vroegere onderzoeken over de Radiumbestraling van bacteriën zouden geringe doses de beweeglijkheid, de kleurstofproductie, het zuurvormend-, het lichtgevend-, het stikstofbindings-vermogen en de virulentie doen toenemen. Bij grootere doses zouden daarentegen al deze eigenschappen in intensiteit afnemen. Ook zou het sporenvormend vermogen onderdrukt worden. Volgens Hadley zou de S-R variatie in de hand worden gewerkt.

Bouchard en Balthazard (7) constateerden reeds in 1906 celstrekking onder invloed van Radiumbestraling³⁾, een verschijnsel dat ook bij ultraviolette bestraling is geconstateerd. Deze gestrekte cellen verloren het vermogen zich te vermeerderen, zoodat hieruit moet worden geconstateerd, dat celstrekking en celdeeling twee van elkaar onafhankelijke functies zijn, waarvan de laatste veel gevoeliger is voor bestraling dan de eerste. Zoo konden *Bruynoghe en Mund* (8) vaststellen, dat door Radiumbestraling gestrekte cellen van *B. typhosum* het vermogen verloren de typhus-phaag te doen vermeerderen, omdat deze cellen zelf hun reproductievermogen hadden verloren.

Voor de hier te beschrijven proefneming werd de techniek van *Lacassagne en Paulin* (9) toegepast⁴⁾. Daartoe werd 1 mgr. in een glazen buisje ingesmolten Radiumsulfaat gelegd in het midden van een met de te onderzoeken stam bestreken cultuurplaat, waarop het geheel in een looden doos werd geplaatst. Zooals bekend is, worden onder deze condities uitsluitend β - en

³⁾ Volgens Schroetter (Zbl. Bakter I, Orig., 104, (1927) *205) zou Radiumbestraling een van de gevoeligste methoden zijn om uit te maken of men met een echte coccus of met een zeer kort staafje te doen heeft, daar de *cocci* zich nimmer strekken.

⁴⁾ Gaarne maak ik van deze gelegenheid gebruik den Directeuren van het Bataafsch Genootschap mijn dank te betuigen voor mij in 1933 voor proefnemingen geschonken Radium.

γ -stralen doorgelaten, waarvan de β -stralen niet verder gaan dan 0,5-1 cm.

In de eerste plaats werd het buisje gelegd op een plaat glucose-krijt-agar bestreken met stam 1101. Het bleek, dat nu bij kamertemperatuur geen groei plaats vond. Daarom werd eerst eenige dagen bij 30°C. bebroed en toen groei was ingetreden, geschiedde de inwerking der stralen verder bij kamertemperatuur om uitdroging van den voedingsbodem te voorkomen. Het bleek — ongeveer zooals dit door *Lacassagne* en *Paulin* bij andere bacteriën was geconstateerd — dat op een afstand van $\frac{1}{2}$ cm. van het Radium de groei van den *Azotobacter*-stam was onderdrukt. Bij microscopisch onderzoek bleek, dat na 2 dagen practisch geen verschil te zien was tusschen de gedaante van de cel bij de groeigrens en verder, namelijk op 4 cm. van het buisje.

Wanneer na 6 dagen bestralen nog eens werd gemicroscopeerd, bleek dat de eerstgenoemde cellen doorzichtig waren en door een scherp gecontoureerde wand waren omgeven, terwijl het inwendige ingedeukt scheen, zoodat het geheel aan de gedaante van roode bloedlichaampjes herinnerde. Andere cellen waren gedeeltelijk korrelig en soms gerekt met korrelige einden. Weer andere cellen waren wat gezwollen, zoodat zij op gistcellen geleken. Ongeveer 40% der cellen had hun gedaante veranderd. De op 4 cm. gelegen cellen waren alle korrelig zooals dit het geval is met de normale *Azotobacter*cellen. Wanneer bacteriën materiaal op $\frac{1}{2}$ en op 4 cm. van het Radium gelegen op glucose-krijt-agar werd uitgestreken, was er practisch gesproken geen verschil tusschen de culturen te zien, wel leverde de uitstrijk van bacteriën materiaal op $\frac{1}{2}$ cm. van het Radium gelegen aanmerkelijk minder bacteriën op dan dat op 4 cm. gelegen.

Wanneer dezelfde proef herhaald werd en men daarbij de Radiumstraling gedurende 2 maanden liet inwerken bleek, dat niet alleen de cellen op $\frac{1}{2}$ cm. afstand gelegen, maar ook die op 4 cm. morphologisch waren veranderd. Deze cellen waren hier en daar vergroot en soms abnormaal gekorrelt. Dit is in tegenspraak met de proefnemingen van andere onderzoekers die van meening zijn dat de γ -stralen, die uitsluitend op grootere afstand dan op $\frac{1}{2}$ à 1 cm. werkzaam zijn, op de bacteriën geen invloed hebben.

Hoewel reeds bij stam 1101 eenige celverlenging onder Radiumbestraling kon worden waargenomen, gelukte het dit verschijnsel veel fraaier aan te toonen bij een fixaat van *Azotobacter* 1401. Hierbij kon worden waargenomen, dat na een week bestralen de lengte tot het 4-6 voudige was toegenomen. Bij dezen stam was verdere cultiveering niet meer mogelijk; bij deze celstrekking was het vermogen tot celdeeling vernietigd.

LITERATUUR:

- (1) *J. J. van Loghem*, *Antonie van Leeuwenhoek*, **4** (1937) p. 113.
 - (2) *F. Löhnis* and *N. R. Smith*, *Journ. Agr. Res.*, **23**, (1923) p. 401.
 - (3) *S. Winogradsky*, *Soil Science*, **43**, (1937) p. 327.
 - (4) *I. M. Lewis*, *Journ. Bact.*, **34**, (1937) p. 191.
 - (5) *A. Prazmowski*, *Centr. Bakter. II*, **33**, (1912) p. 292.
 - (6) *D. Burk* and *H. Lineweaver*, *Journ. Bact.*, **19**, (1930) p. 389.
 - (7) *Ch. Bouchard* et *Balthazard*, *C. R. Acad. d. Sc.*, **142**, (1906) p. 819.
 - (8) *R. Bruynoghe* et *W. Mund*, *C. R. Soc. Biol.*, **92**, (1925) p. 464.
 - (9) *A. Lacassagne* et *A. Paulin*, *C. R. Soc. Biol.*, **92**, (1925) p. 61.
-

De regeneratie van zoogenaamde „gaslooze” paratyphusstammen in calciumformiaat-peptonwater.

DOOR

Dr. A. W. POT.

Ongeveer zes jaren geleden kweekte ik uit ontlasting en urine van twee lijders aan paratyphus een drietal stammen van het type „Schottmüller”, die wel zuur, maar geen gas vormden uit druivensuiker en uit de overige suikers en alcoholen, welke door paratyphusbacteriën vergist worden.

In samenwerking met *Dr. A. Tasman* zijn deze gaslooze varianten nader onderzocht. Wij vonden daarbij o.a. dat, wanneer van deze stammen reeksen overentingen werden aangelegd in peptonwater, waaraan calciumformiaat was toegevoegd, na korteren of langeren tijd in sommige buizen gas kon worden aangetoond.

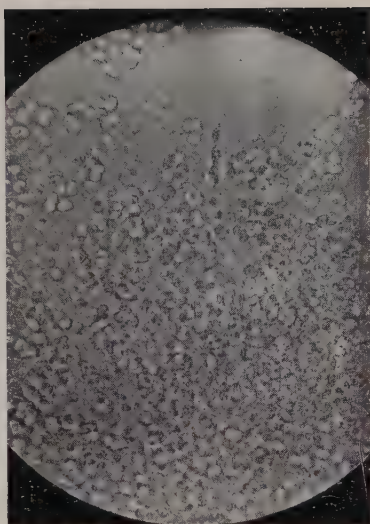
Werd met een druppel van den inhoud van zoo'n buisje een Endoplaat bestreken en werden afzonderlijke kolonies van deze plaat geënt in buizen met druivensuikerbouillon, dan bleek, dat een gering aantal uit deze suiker, in 24 uur, gas vormde. Het buisje calciumformiaatpeptonwater bevatte dus een mengsel van vele gaslooze en weinig gasvormende paratyphusbacteriën. Niet alleen de hier gekweekte gaslooze paratyphusstammen konden op deze wijze tot gasvorming worden gebracht, maar ook vier „Schottmüller”-stammen, welke *Dr. Hohn* ons uit Essen toezond.

Na de publicatie van dit onderzoek kwam mij ter oore, dat twee bacteriologen, die onafhankelijk van elkaar, getracht hadden het verschijnsel te reproduceeren, daarin niet geslaagd waren.

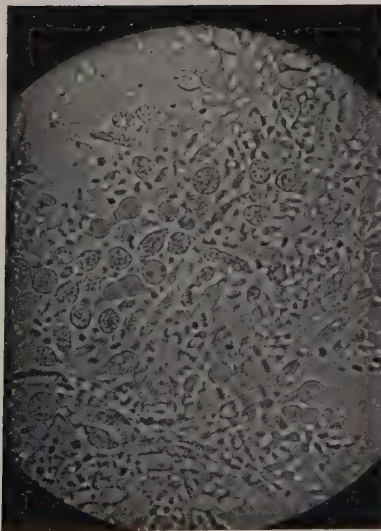
Ik wil daarom in het volgende de geschiedenis meedeelen van een gasloozen stam van het type „Aertrycke” (*Salmonella*



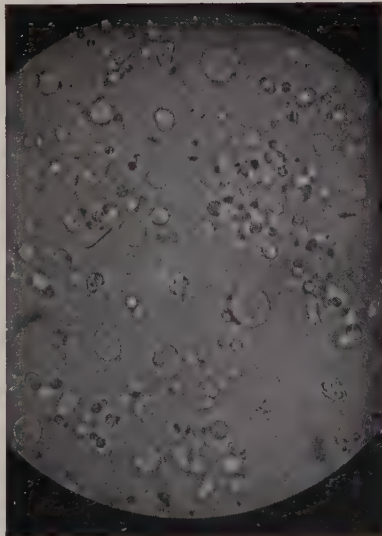
Afb. 1. *Az. chroococcum* 1011. 500 x
Normaal.



Afb. 2. *Az. chroococcum* 1011. 500 x (op
glucose-krijt-agar met 2 0/0 KNO₃).



Afb. 3. *Az. chroococcum* 1401a. 500 x
(uit 1 0/0 peptonwater met 2 0/0 glucose).



Afb. 4. *Az. chroococcum* 1401c. 500 x
(zuurvormend).

typhi murium), dien ik in Juni van dit jaar (1937) uit ontlasting kweekte.

Op 24 Juni entte ik den stam vanaf één der buizen van de „bonte rij” op gewone voedingsagar over. Uitgaande van dezen agarkweek legde ik een reeks van 25 dagelijksche overzettingen aan in peptonwater, waaraan 1% calciumformiaat was toegevoegd. De eerste buis werd geënt den 26sten Juni, de laatste van deze reeks den 20sten Juli. Deze buizen werden tot den 23sten Augustus in de broedstoom van 37° C bewaard; tot op dien datum toonde geen enkele buis ook maar een spoor gas. Den 2den Augustus ging ik door uitstrijken van een druppel uit elk der buizen over Endo-agar na of zij nog levende paratyphus-bacteriën bevatten, hetgeen inderdaad het geval bleek te zijn.

Den 3den Augustus begon ik een nieuwe reeks, waarbij ik uiting van den kweek van 26 Juni, die toen 38 dagen oud was. De opeenvolgende dagelijksche overzettingen werden gemerkt: a, b, c, enz.

In deze „zijlinie” liet de gasvorming niet lang op zich wachten (zie tabel).

Den 16den Augustus werd vanuit „f” overgeënt in een nieuw buisje calciumformiaatpepton, waarin den 19den Augustus gas werd waargenomen. Den volgenden dag werd met een druppel uit deze laatste buis een Endoplaat bestreken. Tien afzonderlijke kolonies op deze plaat werden in glucosebouillon geënt. Twee glucosebouillonkweeken hadden na 24 uur gas gevormd; een Endoplaat, met een druppel uit één dezer buizen bestreken, leverde slechts gasvormende kolonies.

	Datum enting	Datum, waarop gas werd waargenomen
a	3 Augustus	geen gas op 25—8
b	4 "	" " " "
c	5 "	" " " "
d	6 "	" " " "
e	7 "	" " " "
f	8 "	16 Augustus
g	9 "	16 "
h	10 "	24 "
i	11 "	geen gas op 25—8
j	12 "	" " " "
k	13 "	22 Augustus
l	14 "	20 "
m	15 "	20 "
n	16 "	23 "
o	17 "	23 "
p	18 "	23 "
q	19 "	25 "

Ook deze gaslooze „Aertrycke” stam kon dus, evenals de, vóór eenige jaren onderzochte, 7 „Schottmüller” stammen tot

gasvorming worden gebracht. Naast de zeer eenvoudige voedingsbodems is hiertoe een zekere dosis geduld nodig, en misschien kan dit geduld alleen verwacht worden van dengene, die van het uiteindelijke welslagen overtuigd is.

LITERATUUR:

A. W. Pot, Zentr. bl. f. Bakt. I Orig. 1932, **125**, 504.

A. W. Pot en *A. Tasman*, ibidem 1932, **126**, 348.

ibidem 1933, **130**, 358.

A. Tasman en *A. W. Pot*, Biochem. Z. 1934, **270**, 350.

Het p-aminobenzolsulfamide als resistentie-beïnvloedende „Wirkstoff”

DOOR

W. A. COLLIER en M. J. VERHOOG.

Terwijl er chemoteurapeutisch van jaar tot jaar nieuwe en belangrijke uitkomsten gepubliceerd werden betrekking hebbende op door protozoën en spirochaeten veroorzaakte infectieziekten, werd de chemotherapie van infectie's veroorzaakt door bacteriën veelal veronachtzaamd. Een levendige belangstelling hiervoor ontstond nadat *Domagk* de hoge therapeutische waarde van het sulfamido-chrysoïdine (Prontosil) had aangetoond en doordat *Levaditi* en *Vaisman*, evenals *Nitti* en *Bovet*, gunstige resultaten hadden verkregen door proeven met prontosil resp. rubiazol.

Uit de systematische proeven, die gedaan werden door *Fourneau* en zijn school, bleek spoedig, dat eenzelfde effect niet alleen door het betrekkelijk eenvoudige p-amidobenzolsulfamide bereikt werd, maar dat deze verbinding, zelfs het uitsluitend werkzame principe is. De vele werkzame derivaten van deze stof, schijnen in het organisme eerst gesplitst te worden, zoodat dan aan het eenvoudigste sulfamide het eigenlijke therapeutische effect is toe te schrijven.

Aan het p-amidobenzolsulfamide zelf schijnt dus de werking verbonden te zijn.

Evenals *Fourneau*, *Tréfouel*, *Nitti* en *Bovet*, hebben ook wij een groot aantal derivaten, deels eenvoudige substitutieproducten, deels diazo-verbindingen, enz. onderzocht.

Overeenkomstig de resultaten van genoemde auteurs, konden ook wij geen duidelijke toename van werking door modificatie's van het molecuul constateeren.

In tegendeel scheen het zoo nu en dan het effect op

streptococcen min of meer te verzwakken. Men zou zich kunnen vereenigen met de inzichten van *Gley* en *Girard* n.l. dat de gecompliceerde verbindingen in het lichaam eerst gesplitst moeten worden, alvorens ze werkzaam zijn.

Heel duidelijk bleek dit bij een vergelijkingsproef, waarbij de infectie der witte muis met streptococcus *Aronson* met dezelfde dosis als het handelspraeparaat prontosil, dus het aminobenzolsulfamide-chrysoïdine, en met het eenvoudige aminobenzolsulfamide werd behandeld. De infectie volgde met verschillende multipla van de dosis letalis, de behandeling met 1,0 cc 1/150 van een waterige suspensie, per 20 gr. muis, subcutaan.

De bepaling van de dosis letalis volgde meest bij een serie witte muizen, die met verschillende verdunningen van de streptococcensuspensie geïnfecteerd waren en wel door steeds het hartebloed te nemen van muizen, die 24 uur tevoren i.p. waren geïnfecteerd. Hierbij werden de volgende resultaten verkregen:

Behandeld met	Multiplum der dosis letalis:	
	1-voudig	10-voudig
Prontosil	8 : 3	8 : 1
Amidobenzolsulfamide	8 · 8	8 : 7

Uit deze proef blijkt duidelijk de betere werking van de eenvoudige verbinding.

Bij een andere proef, waarbij de behandeling slechts 1 keer volgde, bleek, dat bij een infectie met de enkelvoudige dosis letalis, van 8 dieren slechts 1 door prontosil genezen werd, terwijl door het eenvoudige aminobenzolsulfamide van de 8 dieren er 4 werden genezen.

De éénmalige behandeling schijnt intusschen slechts bij uitzondering en dan nog wel bij heel zwakke infectie voldoende te zijn voor genezing. In den regel is herhaling der behandeling noodzakelijk. Doch zelfs ook bij een driemaal herhaalde behandeling door subcutane injectie's kwam het voor, dat alle dieren stierven, al was het dan ook na langer tijd.

Wij mogen aannemen, dat deze uitzonderingen te wijten zijn aan de buitengewoon hoge virulentie van de door ons steeds gebruikte ARONSON-stam. Zulke uitzonderingen deden

zich niet alleen voor bij het eenvoudige aminobenzolsulfamide, maar ook bij het direct voor injectie's aanbevolen prontosil soluble van de I.G. Farbenindustrie. Dit laatste leek ons minder goed te voldoen dan het gewone prontosil. Beide zijn echter zonder twijfel minder werkzaam dan het eenvoudige aminobenzolsulfamide ¹⁾.

De werking van het aminobenzolsulfamide bepaalt zich intusschen niet uitsluitend tot streptococcen, veeleer wordt ook de pneumococcen-infectie van de witte muis beïnvloed, alhoewel in geringer mate.

De maximale werking verkregen wij bij onze proeven met *Pneumococcus* Type 1 (stam Amerika) bij een infectie met de enkelvoudige dosis letalis, de 10-voudige letale dosis werd reeds niet goed meer beïnvloed. Bij dezelfde proef werkte intusschen het meer gecompliceerde prontosil in het geheel niet.

De proef werd als volgt gedaan:

Witte muizen werden i.p. met verschillende doses van *Pneumococcus* Type 1 geïnfecteerd. Hiervan werd een deel denzelfden dag, en na 24 en 48 uur met 1.0 cc. 1/150 van een suspensie van aminobenzolsulfamide resp. prontosil en een ander deel eveneens met een oplossing van een gemakkelijk oplosbare aminobenzolsulfamide-derivaat in de verd. 1/150 sbc. behandeld. De letale dosis der infectie werd bij een groot aantal muizen bepaald. De resultaten zijn in de volgende tabel weergegeven:

Behandeld met	Multiplum der dosis letalis:	
	1-voudig	10-voudig
Prontosil	8 : 0	8 : 0
Amidobenzolsulfamide	8 : 4	8 : 0
Amidobenzolsulfamide (oplossing) .	8 : 8	8 : 4

Hieruit blijkt duidelijk, dat bij de pneumococcen-infectie der witte muis het aminobenzolsulfamide-chrysoïdine zelfs bij éénmalige dosis letalis onwerkzaam is, dat het aminobenzolsulfamide hier nog duidelijk effect heeft, het oplosbare product zelfs nog bij de 10-voudige letale dosis. Ook bij proeven met

¹⁾ p-amidobenzolsulfamide, werd ons door „Chemifa”, Amsterdam ter beschikking gesteld, die het als „Erysipan” in den handel brengt.

Het blijkt dus, dat vooral den eersten tijd na de behandeling een duidelijke virulentie-vermindering viel op te merken. Dit virulentieverlies wordt later weer gecompenseerd, daar de infectie met een groot aantal bacteriën is gevolgd, met de bedoeling bij de overenting van het peritoneale exsudaat zeker een sterker groei te verkrijgen.

Daar reeds tevoren aangetoond was, dat het effect van het sulfamide bij onzen streptococcenstam bij de infectiedosis met de 1000-voudige dosis letalis zijn grens heeft, behoeft men zich niet te verwonderen, wanneer bij een sterkere infectie de niet-beïnvloede kiemen spoedig de aangetaste beginnen te overwoekeren. In ieder geval echter schijnt het, dat het bij de behandeling met aminobenzolsulfamide tot een virulentieverlies bij de streptococcen komt. Dit is heel goed aan te nemen want, terwijl volvirulente streptococcen door natuurlijke afweermiddelen niet worden aangetast, leggen zwak virulente of avirulente coccen het in den regel af tegen de natuurlijke afweermiddelen van het lichaam.

De wijze van werking van het aminobenzolsulfamide is nog volkomen onverklaard. In het algemeen kan men dienaangaande het volgende opmerken:

- 1e. Het effect treedt op bij gebruik van betrekkelijk kleine doses.
- 2e. Eerst bij herhaling treedt het effect duidelijk op.
- 3e. Er wordt geen direct, tegen streptococcen gericht effect in vitro waargenomen.

Houdt men met deze punten rekening, dan kan men zeggen, dat het om een werkend agens gaat, dat bij herhaalde kleine doses een bepaalden toestand van het organisme te voorschijn roept, die voor de afweer van bepaalde infectie's doelmatig is.

Men zou derhalve geneigd zijn, het aminobenzolsulfamide als afzonderlijke kategorie naast de vitaminen, hormonen e.a. „Wirkstoffe” te plaatsen. Ook deze werkzame stoffen zijn gedefinieerde chemische lichamen, hoewel dit ook eerst sedert korten tijd duidelijk is geworden. Bij deze stoffen leerde men éérs haar werking kennen en eerst later haar wezen en constitutie. Hier is het juist omgekeerd; hier bleek eerst de werking bij het chemisch zuiver samengestelde praeparaat. Uit verdere proeven zal moeten blijken of de resistentie van verschillende

dierspecies enz., tegen bepaalde ziekteverwekkers, niet op het aanwezig zijn van analoge, misschien zeer eenvoudige verbindingen in het organisme berust. In ieder geval treedt bij toevoeging van aminobenzolsulfamide een duidelijke resistentie van het organisme tegen streptococcen op.

Met een eenvoudig chemotherapeuticum in klassieken zin hebben wij hier zeker niet te maken.

Een bruikbaar arseenpraeparaat b.v. zal bij een bepaalde dosis gevoelige kiemen steeds doden. Steeds zal men bij een bepaalde minimum doseering in 100% der gevallen genezing zien. Eerst bij kleinere dosis worden slechts een gedeelte van de dieren genezen, terwijl een ander deel toch aan de infectie ten gronde gaan. Hier zijn de verhoudingen echter van dien aard, dat zelfs bij maximale doseering, steeds een gedeelte van de behandelde dieren niet konden worden genezen, zelfs bij de sterkste behandeling bleef het medicament bij een aantal individuen in gebreke. Dit pleit daarvoor, dat bij de genezing de resistentie van het individu zeker op den voorgrond treedt.

Nog iets anders pleit voor de beïnvloeding der resistentie door het aminobenzolsulfamide: Bij een klassiek chemotherapeuticum speelt het aantal aanwezig zijnde ziekteverwekkers slechts een ondergeschikte rol. Het maakt geen groot verschil of een enkele trypanosoma of miljoenen van deze parasieten in het organisme aanwezig zijn. Ze worden, ongeacht het aantal flagellaten dood, vooropgesteld, dat van het medicament een voldoende werkzame dosis wordt gegeven.

Bij de aminobenzolsulfamiden speelt echter het aantal ziekteverwekkers een buitengewoon belangrijke rol. Bij de door ons steeds gebruikte streptococcen-stam (Aronson), gelukte b.v. de genezing niet meer bij een infectie met de 1000-voudig dodelijke dosis. De kans op genezing houdt nauw verband met de sterkte van de infectie.

Dit verplaatst duidelijk het zwaartepunt van het effect naar de resistentie van het organisme.

Wij kunnen derhalve in het aminobenzolsulfamide het type van een resistentie-verwekkende, resp. resistentie-versterkende stof zien en deze chemische verbinding als afzonderlijke categorie naast de verschillende andere specifieke „Wirkstoffe” plaatsen.

Samenvatting:

Het p-aminobenzolsulfamide b.v. „Erysipan” enz., vertegenwoordigt het type van een resistentie-verwekkende of resistentieversterkende stof.

Tegen de streptococcen-infectie van de muis is de niet gesubstitueerde verbinding het meest werkzaam. Ten minste het gelukt niet door substitutie versterking der werking te verkrijgen.

Naast een uitgesproken werking tegen streptococcen, die intusschen bij een hoogen graad van infectie (streptoc. Aronson: 1000-voudige dosis letalis) uitblijft, blijkt bij een zwakke infectie ook een duidelijke werking tegen pneumococcen te bestaan. Bij de genezing schijnt het tot een virulentieverlies der kiemen te komen.

Een poging tot het cultiveeren van lepra-bacillen

DOOR

Dr. SARDJITO en Dr. A. MOCHTAR.

INHOUD:

Eerste hoofdstuk.

- I. De klinische beschrijving.
- II. De pathologisch-anatomische bevinding
a. Verkort sectie verslag.
b. Verslag van het weefselonderzoek van Dr. G. A. van der Horst.
- III. Het bacteriologisch onderzoek
a. De cultureele eigenschappen
b. De bacterioskopie
c. De virulentieproef bij proefdieren.
- IV. Beschouwingen in verband met de klinische, pathologisch-anatomische en bacteriologische bevindingen.

Tweede hoofdstuk.

- I. Antigenen eigenschappen onderzoek van de geïsoleerde zuurvaste bacillen
a. De agglutinatie
b. De allergische reactie
c. De complementbindingsproeven met konijnen antisera
d. De complementbindingsproeven met menschen sera.
- II. Een vergelijking tusschen de resultaten der complementbindingsreactie met extract van zuurvaste bacillen en die verkregen met alcoholisch runderhart extract bestemd voor de Bordet-Wassermann reactie met de theoretische beschouwingen.

Samenvatting en conclusie.

EERSTE HOOFDSTUK.

1. De Klinische beschrijving.

Het uitgangspunt van het onderzoek was de volgende patiënt:

Een Javaan van Mohammedaanschen godsdienst, Sidik

genaamd werd op 11 Mei 1932 in de C.B.Z. van Semarang opgenomen. Hij was een arme koelie, ongehuwd, pl.m. 35 jaar oud, analphabeet, en reeds pl.m. 6 jaar ziek. In de anamnese werd geen contact met andere leprozen opgegeven; hij had vroeger nu en dan neusbloeding. De patiënt vertoonde op zijn borst, buik, rug en armen anaesthetische vlekken; verder had hij verdikte nerv. ulnares, geatrophieerde thenar, hypothenar, en m.m. interossii met de ontwikkeling van de klauwhanden. De tropische stoornissen gaven aanleiding tot mutilaties der vingers en vorming van mal perforans aan beide voeten.

Bact. leprae waren in het neussecreet aan te toonen, in het prikkelserum van de oorlel en het vingerbloed waren ze daarentegen negatief.

Wij hebben hier het beeld van lepra, type N_s.

Hij werd behandeld met intramusculaire chaulmograolie-injecties en later met geïodeerde aethylester chaulmograe.

Bij verder vervolgen vertoonde de patiënt geen temperatuursverhoogingen, doch de bloedbezinking was hoog n.l. 81 na 2 uren op 12 Mei 1932. Om de week werd de bloedbezinking bepaald, welke schommelde tusschen 63 en 95.

De urine bevatte bij aankomst eiwit, urobiline, erythrocyten en enkele cylinders; een week later werd de urine normaal.

De toestand bleef onveranderd tot 27 Juli 1932, waarbij de dagtemperatuur steeg tot 37,9. Op de injectieplaats in zijn linkerbil ontwikkelde zich een infiltraat, dat behandeld werd met Burowi-compressen. Op de daarop volgende dagen herhaalde zich de temperatuursverhoging n.l. op 30 Juli 1932 kreeg de patiënt koorts van 38,5°. Hierna bleef de temperatuur onregelmatig subfrebiel met nu en dan een top van 38,6°. Het infiltraat ontwikkelde zich verder en fluctueerde later. Bij punctie kwam er pl.m. 50 cc. groenachtig bruine pus. Den 29en Augustus 1932 kregen wij van coll. J. B. Sitanala en Dr. R. Boentaran, die de bovengenoemde patiënt behandelden, het steriel opgezogen punctaat van de nog fluctueerende zwelling. De pus bevatte bij microscopisch onderzoek zuurvaste bacillen. Een abscesvorming ten gevolge van chaulmogra olie injecties heeft ook Pattiradjawane bij 4 patiënten waargenomen.

Verder werd de pus op 29 Augustus 1932 op voedingsbodems geënt n.l. op Lubenau, Sauton, en die van Kirchner (Minser,

Syser, Minasser), terwijl ook 2 caviae subcutaan en intramusculair met het materiaal ingespoten werden.

Terugkomende op de oorzaak van het ontstaan van het absces met de zuurvaste bacillen.

1e. Kunnen wij ons voorstellen, dat ten gevolge der herhaalde intramusculaire injecties in de billen, ter plaatse een locus minoris resistentiae ontstond, waardoor de enkele zuurvaste bacillen uit het neusslijmvlies, langs de bloedbaan, daar terecht komende een goeden voedingsbodem vonden voor hun vermenigvuldiging, zoodat er een absces gevormd werd.

2e. Is de mogelijkheid niet uitgesloten, dat het absces een t.b.c. koud absces, afkomstig van de in de buurt liggende botten, zou zijn.

Op grond van de laatste overweging heeft coll. Dr. R. Boentaran Röntgen-foto's van het bekken doen vervaardigen.

De uitslag van dit onderzoek door Dr. R. M. Notokworo verricht luidde als volgt:

Foto op 30-8-1932 opheldering vermoedelijk van het os ilium bij de articulatie ilio-sacralis, t.b.c.?

Foto op 13-10-1932 opheldering nog duidelijker te zien.

Foto op 16-12-1932 opheldering niet alleen aanwezig, maar schijnt zich caudaalwaarts uitgebreid te hebben.

Ook werd naar eventueele t.b.c.haarden in de longen gezocht.

De ziektegeschiedenis op den 26-9-1932 luidde:

Percussie: subclaviculaire streek aan den rechterkant tympanitisch met doostoon.

Auscultatie: In de longtoppen crepitatie en ronchi. In de subclaviculaire streek aan den rechterkant is verscherpt in- en expirium gevonden, ronchi op den rug overal gehoord.

Sputum: geen zuurvaste bacillen.

Pirquet's reactie: positief.

De temperatuur gedurende Augustus en September was normaal. De bloedbezinking was steeds hoog tusschen 80 en 90. Zijn de longafwijkingen tot dusver nog twijfelachtig, duidelijker werden ze op 12-12-1932, met de volgende klachten: Patiënt werd sinds gisteren benauwd zonder koorts. De beide bovenkwabben van de longen vertoonden verkorte percussie-toon, achter om de hilus links en rechts gedempt tympanitisch. Over de heele rechterlong en over de bovenkwab der linkerlong

werden kleinblazige vochtige ronchi gehoord. Het sputum bevatte zuurvaste bacillen.

Verslag van Röntgenonderzoek van coll. Dr. R. M. Notokworo luidde: Op 21-10-1932. In beide longen uitgebreid vrij egaal verspreid liggend vanaf de apex tot cauda, kleine ronde vrij scherp begrensde vlekjes, die hier en daar zijn samen gevloeid tot grootere onregelmatige vlekken. Het geheel heeft het aspect van honingraat. Rechts langs de corschaduw een breede sluiering. Op 16-12-1932 over de heele long beiderzijds uitgebreide kleine ronde vrij scherp omschreven vlekjes, vrijwel egaal over de long verspreid, hier en daar een enkele onregelmatige grootere dichte vlek vermoedelijk ontstaan door confluereen van kleinere. Langs mediastinaal schaduw rechts een breede ongelijkmatige sluier waar de rechter hilus zich moet bevinden. Linker corschaduw niet scherp begrensd, gaat hier en daar geleidelijk over in de schaduw in de long.

In het verdere beloop der ziekte kreeg de patiënt op den 16en Januari 1933 lymphadenitis aan beide liezen. De rechter bubo adenitis op den 3en Februari 1933 en de linker was op den 20sten Februari 1933 doorgebroken. De pus bevatte zuurvaste bacillen, solitair en ook in groepjes van 3—4 liggend, die koreling vertoonden.

Op den 12en April 1933 kreeg de patiënt haematurie, waarbij in het urine-sediment zuurvaste bacillen gevonden werden.

Op den 8sten Mei 1933 vertoonden de caviae dd. 12 April 1933 ingespoten met urine- en sputum-sediment, zuurvaste bacillen op de entingsplaats.

Op den 8sten Juni werden de reacties van von Pirquet en van Mitsuda verricht; de eerste gaf een roode ontstekingsvlek van 3 bij 4 cM. en de tweede gaf na 2 weken een $\frac{1}{2}$ gerstekorrel groot knobbeltje.

Op den 28sten Augustus 1933 was de linker knie pijnlijk opgezet, vertoonde ballottement van de patella. Op den 1sten October klaagde de patiënt steeds over pijnen in de linkerzij.

Op den 1sten November was de toestand stationair.

Op den 12den December 1933 ging de patiënt achteruit, klaagde over moeilijk slikken.

Op den 19den December trad de dood in.

Het gewicht van den patiënt op 27 Mei 1932, 17 dagen na de opname in de C.B.Z. was 47,8 K.G., dat op 30 September 1932

slechts tot 47,2 K.G. achteruitging, terwijl in het begin van Augustus reeds het bil-absces zich ontwikkelde en in het eind van September 1932 het begin van de longverschijnselen geconstateerd werden.

Langzaam ging het gewicht achteruit tot 46,8 op den 25sten November 1932, tot 44 K.G. op den 26sten Mei 1933, 44,8 K.G. op 23 Juni, 44 K.G. op 7 Juli, 42,8 K.G. op 10 Augustus, 43 K.G. op 7 September, 42,5 K.G. op 4 October, 40 K.G. op 20 October en 36 K.G. op den 2den November 1933.

De temperatuur en pols waren vanaf binnenkomst in de C.B.Z. op 11 Mei 1932 t/m 26 Juli 1932 steeds normaal; de temperatuur schommelde tusschen 36° — 37° en de pols tusschen 72 en 80. Hierna kwam de periode van de ontwikkeling van het bil-absces, waarbij de temperatuur en ook overeenkomend daarmee de pols, onregelmatig verhoogd was, maar toch de temperatuur van 38° meestal niet overschrijdend, slechts nu en dan met toppen van 38, en 38,5 op 30 Juli 1932 op 18, 19, 20, 28 en 29 Augustus 1932. Hierna daalde de temperatuur tot de normale hoogte gedurende de maanden September, October en November. Weer kregen wij een paar keeren verhoogingen n.l. 38° op den 3den en 39° op den 4den December 1932. Verder verliep zij weer normaal $8\frac{1}{2}$ maanden lang in 1933. Op den 19den September 1933 werd de temperatuur onregelmatig subfebriel. In November en December werd zij intermitterend met lage toppen van 38—38,5. Hooge koorts en heeft de patiënt tot aan zijn dood toe niet gekend.

De bloedbezinking was aanhoudend hoog boven 63 en meestal was zij 85—90.

Uit de klinische gegevens kan geconcludeerd worden dat de patiënt Sidik zeker aan lepra type N₃ leed.

De afwijkingen in de linkerbil, in de longen, in de nieren en in de liesklieren werden veroorzaakt door zuurvaste bacillen. Het is nu van belang om uit te maken of deze bacillen mucobac. leprae, of mucobac. tuberculosis dan wel een mengsel van deze twee soorten bacillen zijn.

Enkele opmerkingen dienen nog gemaakt te worden over het klinische beloop.

1e. De voortdurend normale temperatuur, uitgezonderd de enkele verheffingen tot $38,5^{\circ}$ bij uitgebreide longafwijkingen met actief proces wordt bij t.b.c. niet vaak waargenomen. Dit

zou, overeenkomende met de bevinding van Eykman, kunnen pleiten voor het bestaan van longlepra. Toch kan hier niet uitgesloten worden, dat wij te doen hebben alleen met t.b.c. van de longen of wel met combinatie van t.b.c. en lepra infectie.

2e. Voor de differentiaal diagnose tusschen leprotische en t.b.c. lymphesklieren heeft Serra de volgende regels opgesteld: In volgorde worden door t.b.c. aangedaan meestal de halsklieren, bovenste thoracaal, axillair en dan pas de inguinale klieren, met de later optredende verweeking. Bij de lepra worden meestal eerst de inguinale lymphesklieren aangedaan, daarna cruraal, submaxillair, axillair, cervicaal en cubitaal, zonder verweeking.

Bij onze patiënt zien we juist buboadenitis van de liezen, die bij het schema van Serra bij de lepra past, doch hier treedt verweeking op, die weer pleit voor t.b.c.infectie, ofschoon Wade aan den anderen kant verweeking der leprotische lymphesklieren ook weer niet zelden ziet.

3e. De op Röntgenfoto geconstateerde arrosie van het bekken, vlak bij de articulatio ilio sacralis, pleit weer voor t.b.c.

4e. De haematurie met zuurvaste bacillen spreekt ook meer voor tuberculose v. d. nier, doch behoeft niet tegen lepra te pleiten.

II. Pathologisch-anatomische bevinding.

a. Verkort sectieverslag van Sidik.

Uitw. schouwing.

Goed ontwikkeld beenderstelsel, zeer vermagerd en slechte voedingstoestand. Normale beharing. De huid op de beide voeten atropisch. Aan beide voetzolen mal perforant aanwezig.

Macroscopische bevinding der organen.

De tong is atrophisch, de tonsillen zijn niet vergroot. Op de epiglottis is een ulcus ter grootte van een dubbeltje, met onregelmatige en ondermijnde randen.

De longen zijn vergroeid met de borstkas door vaste strengen, op doorsnede talrijke kleine verspreide witgrijze bronchogene haarden. In de linker bovenkwab is een caverne ter grootte van een cent aanwezig.

De bronchiale lymphesklieren zijn vergroot en gezwollen. Aan het hart zijn geen bijzondere afwijkingen te vinden. Hartspier is normaal.

Aan de aorto wand zijn kleine witglanzende haardjes te zien.

Lever: normaal van grootte. De oppervlakte is min of meer fijn hobbelig, bij doorsnede geen kaashaarden te zien. Vast van consistentie.

Milt is niet vergroot. Gemakkelijk van de omgeving af te pellen. Bij doorsnede geen kaashaarden.

L. Nier: klein en geschrompeld tot 3 vingers breedte; op doorsnede ziet men in de schors v. dubbeltje tot kwartje grootte wit gele haarden. Pyelum normaal, niet verwijd.

R. Nier: Normaal van grootte, gladde oppervlakte. De kapsel is gemakkelijk af te pellen.

Bij doorsnede geen bepaalde afwijkingen te vinden. Het pyelum is normaal.

b. Verslag van het weefselonderzoek door Dr. G. A. v. d. Horst.

De kleine nier met verkazing vertoont bij microscopisch onderzoek duidelijke teekenen van chronische ontsteking (hyaline glomeruli, cylinders, vaatwand verdikking enz.) waardoor de verkleining van de nier verklaarbaar is. Verder vindt men in dezelfde nier uitgebreide verkazing en duidelijke tuberkels met reuzencellen.

Eveneens zijn in de levers talrijke tuberkels met reuzencellen (type Langhans): verder wat vervetting en atrophie.

In de long behalve wat fibrose en anthracose, zijn te vinden duidelijke verkaasde tuberkels met Langhansche reuzencellen.

In deze organen zijn geen lepomen te zien.

III. Bacteriologisch onderzoek.

Boven is even vermeld, dat punctie materiaal uit het bilabsces dd. 29 Augustus 1932 in den voedingsbodem van Lubenau, van Sauton en dien van Kirchner (Minser, Syser, Minasser) geënt werd, terwijl ook 2 cavia's subcutaan en intramusculair in de rechter dij daarmede ingespoten werden.

Tot onze groote verbazing zagen wij op den 13den September 1932 op de Lubenau voedingsbodem reeds een welige groei, gelijkende op een cultuur van een t.b.c.stam van 1½—2 maanden oud.

Microscopisch was het een reincultuur van zuurvaste bacillen.

In de vloeibare voedingsmedia werd een vlokkige massa op den bodem van de buis gevormd.

Met de cultuur uit den voedingsbodem van Lubenau werden op 13-9-1932 twee cavia's intramusculair en subcutaan geënt.

Een week later op 20-9-1932 werden met dezelfde cultuur nog ingespoten:

a. een grijze aap (*Mac. Cynomolgus*) subcutaan op de rechter arm en submuceus op den bodem van den rechterneusopening.

b. een zwarte aap (*Semnopithecus maurus*) subcutaan op de rechter arm en submuceus op den bodem van den rechterneusopening.

c. een konijn subcutaan onder de buikhuid.

d. een konijn intraperitoneaal.

e. een witte muis subcutaan.

f. een witte rat subcutaan.

De primaire cultuur werd op den 1sten November 1932 overgeënt nogmaals op Lubenau voedingsbodem en op 14 November 1932 werden met de subcultuur ingespoten:

g. twee kippen intraveneus

h. een konijn intraperitoneaal, (de bacillen gesuspenderd in steriele boter.)

i. een zwarte aap (*Semnopithecus maurus*) submuceus op den bodem van de rechterneusopening.

Op 30 November 1932 werden verder ingespoten:

j. twee cavia's intraperitoneaal.

A. De cultuureigenschappen der bacillen van stam Sidik.

Met het nagaan der eigenschappen van de cultuur, verkregen uit het punctaat van het bilabsces, werd getracht nader te komen tot de beantwoording der vraag of wij hier te doen hebben met *mucobacterium leprae*, dan wel met *mucobacterium tuberculosis*.

Over het algemeen hebben deze bacillen van stam Sidik dezelfde cultureele eigenschappen als die der gewone t.b.c.-bacillen, echter met enkele kleine quantitatieve verschillen. Toch zijn sommige dezer verschillen weer niet constant. Zooals boven reeds vermeld is, groeide de stam Sidik eerst welig eugonisch (Griffith), doch de subculturen van 1934 en later groeiden even langzaam als de gewone t.b.c.culturen.

In tabelvorm gerangschikt worden de groeieigenschappen met die van een t.b.c.stam 1773 vergeleken.

Voedingsmedia	Stam Sidik	t. b. c. stam 1773
Lubenau . . .	droog kruimelig vuilwit	droog kruimelig vuilwit
Aardappel . . .	" " "	" " "
Löwenstein . .	" " "	" platte groei
Petragnani . .	" (betere groei) "	" kruimelig geelwit
Petroff	droog kruimelig vuilwit meer gele tint	" platte groei vuilwit
Glycerine bouillon	eerst vlokkelig bezinksel, later met ontwikkeling van vlies	vliesvorming met korrelig bezinksel

In voedingsmedia van Sauton, van Kirchner (Minser, Syser, Minasser) gedraagt de cultuur zich als in glycerine bouillon en wel met vorming van vlokkelig neerslag om later na 1½ maand of later een dun rimpelig vliesje op den vloeistofspiegel te vertoonen, dat neiging heeft aan den buiswand op te klimmen.

Op de verschillende voedingsmedia heeft de cultuur de geur van jasmijn.

Op glycerine agar kan men bij jonge cultuur van 1—2 weken de R en S kolonies van Petroff onderscheiden.

Op gewone voedingsagar vertoont de stam een heel magere groei, zooals door jonkvrouw van Riemsdijk bij t.b.c. is beschreven.

Op kamertemperatuur in de tropen wilden de eerste generaties niet groeien, doch bij herhaling van de proef in eind 1936 is er wel groei te constateeren in de gewone kamertemperatuur ofschoon heel langzaam.

Onder de zwakke vergrooting heeft een vlokje cultuur, genomen van den bodem van de buis met vloeibare voedingsmedia de vorm van een medusa-hoofd met gekronkelde uitloopers.

Deze medusa-vorming is gewoonlijk, echter in mindere mate, bij de t.b.c.culturen te zien; in enkele gevallen is zij ook weer even sterk als bij den stam Sidik.

Wrijft men een partikeltje van de cultuur op een objectglas met een platina-lus fijn, dan merkt men op, dat de cultuur gemakkelijk fijn te wrijven is, wat niet het geval is met t.b.c.cultuur

type humanum en bovinum, maar wel bij aviaire type. Bij dit onderzoek is dus geen doorslaggevend kenmerk gevonden, hetwelk de stam Sidik zou onderscheiden van t.b.c.stammen.

B. Microscopische kenmerken der bacillen van stam Sidik.

De bacillen in het punctaat uit bilabsces zijn zuur- en alcoholvast, gram positief, ze zijn in het midden van het bacillenlichaam bij kleuring volgens Ziehl—Neelsen voorzien van donkere korrels (zwart rood); zij zijn in groote hoopen vereenigd of wel verspreid.

Van de jonge, 6 dagen oude cultuur zijn de bacillen bijna alle zuur- en alcoholvast, slechts hier en daar zijn blauwe niet zuurvaste bacillen tusschen de roodgekleurde te vinden. Ze zijn verder onbeweeglijk.

Om een indruk van de grootte te hebben, werd getracht een paar metingen te doen in praeparaten, gemaakt van een cultuur die 14 dagen oud is. De bacillen zijn echter verschillend van grootte; korte, haast puntvormige tot langgerekte lichamen, welke voorzien zijn van korrels, zijn te vinden. Het langste exemplaar is $3,2 \mu$, de dikte is $0,5 \mu$. De meest voorkomende bacillen zijn $1,5$ — $1,6 \mu$ lang.

In een andere cultuur is de korreling niet zoo sterk; hier ziet men dan een fijne rechte of gebogen streep met een duidelijke knop, meestal aan het einde van de bacil gelegen, doch soms zit de knop ook in het midden.

In andere culturen van 10—14 dagen zijn de bacillen fijner, ze liggen evenwijdig ten opzichte van elkaar en vormen groepjes. Verschillende vormen zooals korrel, staaf, knods, worden in een praeparaat gevonden.

Uit de studie der onderlinge ligging der bacillen zou de kolonie als volgt kunnen worden voorgesteld.

De bacil die b.v. korrels, zooals de afbeelding aangeeft, in zich heeft, valt bij de verdere ontwikkeling uiteen, waarbij de korrels ten opzichte van elkaar apart komen te liggen. Daarna ontwikkelt zich uit elke korrel aan beide polen een uitlooper, welke als slechts een scherpe hoek maakt met die der oorspronkelijke bacil.

Bij den verderen groei en vermenigvuldiging schuiven de bacillen langs elkaar, mogelijk bij elkaar gehouden door een middenstof (interbacillaire substantie). Want vaak worden

bacillen waargenomen in een roseachtig veld of in een veld, dat minder kleurstof aanneemt dan de omgeving. Ook dit verschijnsel is niet constant.

De waargenomen korrels zijn bij t.b.c.bacillen reeds door v. Babes en P. Ehrlich opgemerkt en later door andere onderzoekers bevestigd. In tegenstelling hiermede, zouden de korrels van Much niet zichtbaar zijn bij kleuring volgens Ziehl—Nielsen, en pas te voorschijn treden bij versterkte Gramkleuring.

De voorstelling van zaken als zouden de bacillen in de verdere ontwikkeling in de korrels uiteenvallen, komt overeen met de opvatting van C. Spengler, die de korrels als splitter aanduidt. Doch als men de korrels een functie van groeicentra toedentkt, dan nadert deze opvatting die der verschillende onderzoekers, die ze beschouwen als ophooping van voedingsstoffen.

E. Grôh heeft de groeiwijze der t.b.c.bacillen bestudeerd en komt tot de stelling, dat zonder de aanwezigheid van korrels de bacil niet tot vermenigvuldiging komt.

De ontwikkeling van den t.b.c.bacil uit de acidoresistente korrel wordt verder door Mej. J. C. H. Broek en ook door Iwo Lominski waargenomen.

Maakt men praeparaten van culturen stam Sidik van verschillende ouderdom dan merkt men soms verschillen in grootte der bacillen en in de tinctie.

C. Virulente proeven met de zuurvaste bacillen van Sidik.

Proefdier cavia No. 127.

1932

- | | | |
|---|-------|--|
| 1 | 29/8 | Punctaat bilabsces met veel zuurvaste bacillen. |
| | 12/9 | Gewicht 540, rechterliesklier twijfelachtig verdikt; entpl. verdikt. |
| | 19/9 | Gewicht 570, rechterliesklier duidelijk verdikt; entpl. nog verdikt. |
| | 26/9 | Gewicht 610, rechterliesklier twijfelachtig verdikt. |
| | 10/10 | Gewicht 670, rechterlieskl. niet meer te voelen; infiltraat genezen. |
| | 27/10 | Gewicht 760, rechterlieskl. niet meer te voelen; infiltraat genezen. |
| | 31/10 | Gedood om de inwendige veranderingen te zien. |
- Longen, lever en milt normaal uitziend, geen vergroote mesenteriale en retroperitoneale lymphklieren.
- Opmerking: Bij gewone t.b.c. proeven, waarbij veel bacillen ingespoten worden, kunnen wij meestal de verandering na 2 maanden reeds constateeren.

Pleit deze proef voor zoogdier- of vogel-t.b.c.?

NEEN.

Proefdier cavia No. 128.

1932

- 2 29/8 Punctaat bilabsces met veel zuurvaste bacillen.
 Ingespoten intramusculair en subcutaan in de rechter dij.
 12/9 Gewicht 410, rechterliesklier niet te voelen; entplaats verdikt.
 19/9 Gewicht 450, rechterliesklier duidelijk verdikt.
 26/9 Gewicht 470, rechterliesklier duidelijk verdikt.
 3/10 Gewicht 470, rechterliesklier duidelijk verdikt.
 10/10 Gewicht 530, rechterliesklier kleiner geworden.
 17/10 Gewicht 540, rechterliesklier haast niet te voelen.
 Rechter lies geopereerd om te zien of in de lymphklier nog zuurvaste bacillen te vinden zijn, het resultaat was negatief.
 24/10 De operatiewond geïnfecteerd, de cavia is ziek.
 25/10 Gedood.
 Longen, lever, milt normaal uitziend, geen vergrooting der mesenteriale en retroperitoneale lymphklieren.
 Opmerking: Met deze proef willen wij de zuurvaste bacillen in de klier zien.
 Pleit deze proef voor zoogdier- of vogel-t.b.c.? NEEN.

Proefdier cavia No. 135.

1932

- 3 13/9 Met cultuur Sidik veel bacillen ingespoten.
 Ingespoten intramusculair en subcutaan in de rechter dij.
 19/9 Gewicht 500, rechterliesklier niet te voelen, injectiepl. verdikt.
 3/10 Gewicht 495, rechterlieskl. twijfelachtig te voelen; inj.pl. verdikt.
 17/10 Gewicht 540, rechterlieskl. als strengen te voelen; inj. pl. verdikt.
 31/10 Gewicht 600, rechterlieskl. als strengen te voelen.
 14/11 Gewicht 630, rechterlieskl. als strengen te voelen; inj.pl. genezen.
 5/12 Gewicht 680, rechterliesklier niets te voelen.
 1933
 16/1 Gewicht 700, rechterliesklier niets te voelen.
 3/4 Gewicht 790, rechterliesklier niets te voelen.
 18/9 Gewicht 1050.
 Een jaar lang geobserveerd; gedood.
 Longen, lever, milt, lymphklieren retroperitoneaal en mesenteriaal normaal.
 Opmerking: Om de eventuele afwijking te zien bij lange observatietijd.
 Pleit deze proef voor zoogdier- of vogel-t.b.c.? NEEN.

Proefdier cavia No. 136.

1932

- 4 13/9 Met cultuur Sidik, 2 weken oud met veel bacillen, ingespoten intramusculair en subcutaan in de rechter dij.
 Het verloop als cavia No. 135.
 Tot 21-9-1933, een jaar lang geobserveerd, gedood, gew. 830 gr.

Longen, lever, milt, lymphklieren retroperitoneaal en mesenteriaal normaal.

Opmerking: Om de eventuele afwijking te zien na een lange observatietijd.

Pleit deze proef voor zoogdier- of vogel-t.b.c.? NEEN.

Proefdier cavia No. 193.

1932

- 5 30/11 Met cultuur Sidik, 2 weken oud veel bacillen.

Intra peritoneaal ingespoten.

5/12 Gewicht 240, geen verschijnselen.

12/12 Gewicht 250, subcutaan op de injectieplaats harde zwelling.

17/12 Gewicht 245, geen verschijnselen.

1933

27/3 Gewicht 500, geen verschijnselen (zwanger?).

25/4 Gewicht 430, geen verschijnselen; gejongd.

20/11 Observatie bijna 1 jaar, het dier is gezond en vet; wordt gedood.

Longen, lever en milt normaal, rechter liesklier ettering met zuurvaste bacillen, retroperitoneaal zijn de lymphklieren verdikt, zuurvaste bacillen negatief.

Opmerking: Om de eventuele verandering te zien na lange observatietijd bij intraperitoneale inspuiting.

Pleit deze proef voor zoogdier- of vogel-t.b.c.? NEEN.

Proefdier cavia No. 194.

1932

- 6 30/11 Met cultuur Sidik, 2 weken oud veel bacillen.

Intra peritoneaal ingespoten.

5/12 Gewicht 290, geen verschijnselen op de injectieplaats.

12/12 Gewicht 320, een harde zwelling.

17/12 Gewicht 365, geen verschijnselen.

1933

27/3 Gewicht 510, geen verschijnselen.

20/11 Observatie bijna 1 jaar, het dier is gezond, werd gedood.

Gevonden: een glazig plekje zonder zuurvaste bacillen aan de punt van de middenkwab van de rechterlong; verder lever, milt normaal, retroperitoneale en mesenteriale klieren niet vergroot.

Opmerking: Om de eventuele afwijkingen te zien na lange observatietijd en bij intraperitoneale inspuiting.

Pleit deze proef voor zoogdier- of vogel-t.b.c.? NEEN.

C₁ Proeven ter verhooging van virulentie der bacillen.

Proefdier cavia No. 8.

1933

- 7 17/1 Met cultuur Sidik, 32 dagen oud veel bacillen.
 Ingespoten intramusculair en subcutaan in de rechter dij.
 Gewicht 310, rechter liesklier verdikt.
- 23/1 Gewicht der cavia 340, rechter liesklier verdikt.
- 30/1 8/2 Gewicht 350, rechter liesklier duidelijk verdikt, spierabsces.
- 20/2 Gewicht 360, rechter liesklier kleiner doch harder.
- 21/2 Gedood, de klier er uitgenomen, fijn gewreven en ingespoten in de cavia. Longen, lever en milt zijn normaal, retroperitoneale en mesenteriale klier niet vergroot.

Proefdier cavia No. 46.

1933

- 8 21/2 Met de klier van cavia No. 8.
 Ingespoten in de rechter dij.
- 27/2 Gewicht 250, geen verschijnselen.
- 28/3 Gewicht 330, geen verschijnselen.
- 29/3 Gedood; de rechterliesklier er uitgenomen, fijngewreven en ingespoten in cavia No. 77, 78 en 79.
 Longen, lever en milt, retroperitoneale en mesenteriale lymphklieren normaal.

Proefdier cavia No. 77.

1933

- 9 29/3 Met klier van cavia No. 46.
 Ingespoten in de rechter dij.
- 3/4 Gewicht 410, geen verschijnselen.
- 15/5 Gewicht 450, rechterliesklier twijfelachtig verdikt.
- 25/5 Gedood.
 In de long en lever een paar als tuberkeltjes uitziende spikkeltjes, zonder zuurvaste bacillen.
 Milt, lymphklieren (retroperitoneaal en mesenteriaal) normaal.
 Pleit deze proef voor zoogdier- of vogel-t.b.c.?

TWIJFELACHTIG.

Proefdier cavia No. 78.

1933

- 10 29/3 Met klier van cavia No. 46.
 Ingespoten in de rechter dij.
- 3/4 Gewicht 380, geen verschijnselen.
- 22/5 Gewicht 510, geen verschijnselen.
- 25/5 Gedood. Long, lever, milt en lymphklieren (retroperitoneaal, mesenteriaal) normaal.
 Pleit deze proef voor zoogdier- of vogel-t.b.c.?

NEEN.

Proefdier cavia No. 79.

- 11 29/3 Met klier van cavia No. 46.
 Uitslag van observatie tot 25-5-1933 en sectie bevinding als
 cavia No. 78.
 Pleit deze proef voor zoogdier- of vogel-t.b.c.? NEEN.

C₂ Proeven ter beantwoording van de vraag of wij hier met
 mycobac. tuberculosis bovinum te doen hebben.

Jong konijn No. 142.

- 12 20/9 Met cultuur Sidik.
 1932 Subcutaan.
 Tot 29-9-1934 ruim twee jaren geobserveerd. Het konijn is dik
 en gezond gebleven.
 Pleit deze proef voor t.b.c. bac. bovinum? NEEN.

Jong konijn No. 143.

- 13 20/9 Met cultuur Sidik.
 1932 Intraperitoneaal.
 Tot 29-9-1934 ruim twee jaren geobserveerd. Het konijn is dik
 en gezond gebleven.
 Pleit deze proef voor t.b.c. bac. bovinum? NEEN.

Jong konijn No. 184.

- 1932
 14 14/11 Met cultuur Sidik.
 1933 Intraperitoneaal met cultuur gesuspendeerd in steriele boter.
 19/9 De onderkaak vertoont een infiltraat; punctaat bevat etter
 zonder zuurvaste bacillen.
 29/9 Konijn gestorven. Bevindingen: abscessen waren aan den
 1934 binnenkant (retroperitoneaal) en in de spier van den buikwand:
 zuurvaste bacillen positief, cultuurproeven hiermede waren
 negatief. De etter ingespoten in cavia No. 125.

Cavia No. 125.

- 1934
 15 29/9 Met etter van konijn No. 184.
 Subcutaan in de rechter dij.
 1/10 Gewicht 400, geen verschijnselen.
 3/11 Gewicht 440, geen verschijnselen.
 19/12 Gewicht 570, geen verschijnselen.
 7/2 Gewicht 590, liesklier twijfelachtig te voelen.
 1935
 2/3 Gewicht 600, geen verschijnselen.
 8/7 Gewicht 630, geen verschijnselen.
 1/8 Gedood; longen, lever, milt en klieren geen afwijkingen.
 Pleit deze proef voor t.b.c. bac. bovinum? NEEN.

Konijn No. 49.

- 16 23/2 Cultuur Sidik.
 1933 Een lus cultuur fijn gesuspendeerd in zoutwater intraveneus ingespoten.
 Tot 31-1-1934 geobserveerd; het konijn gezond gebleven.
 Pleit deze proef voor t.b.c. bac. bovinum? NEEN.

C₃ Proeven ter beantwoording der vraag of wij hier met mycobac. tuberculosis aviaire type te doen hebben.

Grijze kip No. 179.

- 17 14/11 Cultuur Sidik.
 1932 Intraveneus ingespoten.
 Tot 20-6-1933 geobserveerd; geen vermagering te zien.
 Gedood; long, lever, milt normaal.
 In uitstrijkpraeparaten van deze organen geen zuurvaste bacillen gevonden.
 Pleit deze proef voor vogel-t.b.c.? NEEN.

Zwarte kip No. 180.

- 18 14/11 Cultuur Sidik.
 1933 Intraveneus ingespoten.
 Tot 1-12-1935, 2 jaren lang geobserveerd.
 De kip is gezond gebleven.
 Pleit deze proef voor vogel-t.b.c.? NEEN.

C₄ Proeven om bijzondere eigenschappen van den stam Sidik te onderzoeken.

1932

- 19 20/9 Een grijze Javaansche aap (Mac. Cynomolgus) No. 140, wordt met stam Sidik subcutaan ingespoten aan den rechter arm en submuceus op den bodem van de rechter neusopening.
 22/9 Neusslijm zuurvaste bacillen +
 26/9 Op de entplaats in de neus een knobbeltje neusslijm, zuurvaste bacillen —
 27/9 Neusslijm zuurvaste bacillen +
 30/9 Infiltraat op de entplaats op de arm met zuurvaste bacillen.
 1/11 Geen knobbeltje meer in de neus en arm.
 1933
 1/9 Een jaar lang geobserveerd. De aap blijft gezond, flink gegroeid.
 1932
 20 20/9 Een zwarte aap (Semnopithecus maurus) No. 141 met cultuur Sidik ingespoten, subcutaan aan de rechter boven arm en submuceus op den bodem van de rechter neusopening.

- 22/9 Neusslijm zuurvaste bacillen +
 26/9 Neusslijm zuurvaste bacillen ++
 30/9 Rechter gezichtshelft iets pasteus.
 3/10 Dood; pneumonie aan de rechter bovenkwab vol zuurvaste bacillen. Lever en milt zonder zuurvaste bacillen.

1932

- 21 14/11 Een zwarte aap (*Semnopithecus maurus*) No. 181 met cultuur Sidik submuceus op den bodem van de rechter neusopening.
 9/12 Gestorven.
 Neussecreet zuurvaste bacillen +
 Submaxillair klieren bacillen +
 Supraclaviculaire klieren bacillen +
 Intraclaviculaire klieren bacillen +
 Larynx secreet bacillen —
 Trachea secreet bacillen —
 Pneumonie rechter boverkwab bacillen +
 Milt, lever, nieren bacillen —

1933

- 22 16/5 Een zwarte aap (*Semnopithecus maurus*) No. 119 met cultuur Sidik subcutaan onder de buikhuid ingespoten.
 In Mei 1934 werd de aap aan de achterpooten verlamd. Eerst kon hij er nog mee kruipen, doch in Juni kon hij ze niet meer verzetten. Hij was anders niet vermagerd.
 Op 6-6-1934 werd hij gedood. Er werd op de entplaats subcutaan geelgrijze verkaasde massa gevonden met weinig zuurvaste bacillen. De longen, lever, milt normaal. Een groote hoeveelheid verkaasde massa was opgehoopt aan weerszijden van de wervelkolom retropleuraal en retroperitoneaal. De druk hiervan op de zenuwen zou dan de verlamming aan de achterpooten verklaren.

1932

- 23 20/9 Een witte rat No. 144 ingespoten subcutaan op de buik met cultuur van stam Sidik.
 20/12 De witte rat gestorven. Gevonden: in de long talrijke ronde blaasjes gevuld met helder slijm, zonder zuurvaste bacillen. In de rechter liesklier zijn enkele overblijfselen van zuurvaste bacillen; lever en milt normaal.
 Pleit deze proef voor vogel-t.b.c.? NEEN.

1932

- 24 20/9 Een witte muis No. 145 subcutaan op de rug met cultuur van stam Sidik ingespoten.
 13/1 De mitte muis gestorven. In de longen een paar knobbeltjes lijkende op gezwel of tuberkel. Gevonden: direct praeparaat hiervan geen zuurvaste bacillen gevonden. Met fijn gesuspens-

deerd materiaal van de longen wordt cavia No. 1, 1934 ingespoten.

Pleit deze proef voor vogel-t.b.c.?

NEEN.

1934

- 25 13/1 Cavia subcutaan intramusculair ingespoten in de rechter achterpoot met longmateriaal van de muis.
 31/1 Gewicht 270 R. liesklier vergroot.
 7/2 Gewicht 280 R. liesklier vergroot.
 7/3 Gewicht 390 R. liesklier vergroot.
 29/3 Gewicht 450 R. liesklier vergroot ziet er ziek uit.
 Gedood. Klierabsces gevonden met zuurvaste bacillen. Uit het absces is een cultuur van zuurvaste bacillen verkregen.

C₅ Proeven met sputum van patiënt Sidik.

Cavia No. 215.

1932

- 26 17/12 Sputum van Sidik zuurvaste bacillen positief.
 Een deel van het sputum plus 2 deelen zwavelzuur van 5%, goed geëmulgeerd en dan gecentrifugeerd. Het sediment weer emulgeeren met zoutsolutie en na neutraliseeren intraperitoneaal ingespoten.
 27/12 Gewicht 205, klein infiltraat op entplaats.
 1933
 16/1 Gewicht 310, geen verschijnselen.
 13/2 Gewicht 340, geen verschijnselen.
 20/3 Gewicht 360, geen verschijnselen.
 25/4 Gewicht 370, geen verschijnselen.
 3/6 Gedood. Longen, lever, milt en lymphklier geen afwijkingen.
 Pleit deze proef voor zoogdier- en vogel-t.b.c.?

NEEN.

Cavia No. 214.

1932

- 27 17/12 Sputum van Sidik zuurvaste bacillen positief.
 Ingespoten met sputum dat eerst behandeld is met zwavelzuur, subcutaan en intramusculair in de rechter achterpoot.
 27/12 Gewicht 380, geen verschijnselen.
 1933
 16/1 Gewicht 430, geen verschijnselen.
 13/2 Gewicht 510, geen verschijnselen.
 20/3 Gewicht 540, geen verschijnselen.
 25/4 Gewicht 600, geen verschijnselen.
 31/1 Ruim een jaar geobserveerd.
 1934 Cavia is gezond gebleven.
 Pleit deze proef voor zoogdier- en vogel-t.b.c.?

NEEN.

Cavia No. 216.

- 1932
- 28 17/12 Sputum van Sidik zuurvaste bacillen positief.
Ingespoten zooals cavia No. 124.
- 27/12 Gewicht 440, geen verschijnselen.
- 1933
- 16/1 Gewicht 810, Rechter liesklier twijfelachtig gezwollen.
- 4/2 Gewicht 900, geen verschijnselen, zwanger.
- 20/2 geen verschijnselen, gejongd.
- 27/2 Gewicht 810, rechter liesklier klein, hard.
- 20/3 Gewicht 790, rechter liesklier klein, hard.
- 3/4 Gewicht 840, rechter liesklier klein, hard.
- 10/4 Gewicht 820, rechter liesklier iets minder.
- 28/4 Gewicht 820, rechter liesklier blijft minder.
- 8/6 Gedood. Longen, lever, milt normaal. Longen en rechter liesklier fijn gewreven, ingespoten in cavia No. 135; voor een deel in Lubenau uitgestreken, kwam niets op 29-11-1933.
- Pleit deze proef voor zoogdier- en vogel-t.b.c.-bac.? NEEN

Cavia No. 135.

- 1933
- 29 8/6 Fijngewreven longen en liesklier cavia No. 216.
Intraperitoneaal ingespoten.
- 26/6 Gewicht 330, geen afwijking.
- 3/7 Gewicht 325, linker liesklier twijfelachtig te voelen.
- 10/7 Gewicht 330, linker liesklier klein te voelen.
- 14/8 Gewicht 350, linker liesklier klein te voelen.
- 15/9 Gewicht 570, linker liesklier klein te voelen.
- 1934
- 31/1 Gewicht 670, linker en rechter liesklier te voelen.
- 7/2 Gewicht 690, linker en rechter liesklier vergroot te voelen.
- 21/2 Gewicht 640, linker en rechter liesklier vergroot te voelen.
- 22/2 Gedood. Longen, lever en milt met tuberkels; liesklieren in absces overgegaan, zuurvaste-bacillen gevonden in tuberkels en absces.
- Pleit deze proef voor zoogdier- en vogel-t.b.c. bac.?
- Kan pleiten voor t.b.c. bacillen.

C_a Proef met urine van patiënt Sidik.

- 1933
- 30 13/4 Urine zuurvaste bacillen positief.
Door Dr. R. Boentaran subcutaan ingespoten.
- 17/5 Cavia gestorven. In de longen veel en in de liesklieren weinig zuurvaste bacillen gevonden.
- Pleit deze proef voor zoogdier-t.b.c.? JA.

C₇ Proef met long van patiënt Sidik.

Cavia No. 210.

1933

- 31 19/12 Longmateriaal van Sidik.
Ingespoten subcutaan en intramusculair in de R. achterpoot.

1934

- 8/1 Gewicht 280, geen afwijkingen.
31/1 Gewicht 400, R. liesklier te voelen; wond op entplaats dicht.
7/2 Gewicht 390, R. liesklier te voelen; wond op entplaats dicht.
14/2 Gewicht 410, R. liesklier vergroot.
14/3 Gewicht 440, R. liesklier groot.
16/5 Gewicht 420, R. liesklier groot; cavia ziek met abscessen i/d lies.
16/5 Gewicht 420, R. liesklier groot; cavia ziek met abscessen i/d lies.
27/6 Gestorven. In de long veel tuberkels; de lever vergroot, milt sterk vergroot bontvlekkig, glad glanzend als bij de groote bonte nier van den mensch, de milt weegt 34,55 gr.
Long uitstrijkpraeparaat bevat veel zuurvaste bacillen.
Lever en milt uitstrijkpraeparaat bevat weinig zuurvaste bacillen.
Pleit deze proef voor zoogdier- en vogel-t.b.c.? JA.

C₈ Vergelijkende virulentie proeven met stam Sidik uit bilabsces en stam Sidik uit de long.

Cavia No. 56.

1936

- 32 19/5 Cultuur Sidik bilabsces.
Ingespoten subcutaan en intramusculair in de R. achterpoot.
23/5 Gewicht 240, geen verschijnselen.
9/6 Gewicht 360, R. liesklier te voelen.
30/7 Gewicht 370, R. liesklier te voelen. Gejongd.
24/9 Gewicht 400, R. liesklier kleiner.
24/10 Gewicht 370, R. liesklier blijft klein.
25/11 Gewicht 460, R. liesklier blijft klein.
1937
26/3 Gewicht 600, R. liesklier blijft klein; absces entplaats.
1/7 Gezond gebleven.
Pleit deze proef voor zoogdier-t.b.c.-bac.? NEEN.

Cavia No. 57.

1936

- 33 19/5 Cultuur Sidik bilabsces.
Ingespoten als cavia No. 56.
23/5 Gewicht 270, geen afwijkingen.
9/6 Gewicht 290, R. liesklier te voelen.
30/7 Gewicht 420, R. liesklier te voelen.
24/9 Gewicht 530, R. liesklier kleiner.
25/11 Gewicht 630, R. liesklier kleiner.

- 1937
 29/1 Gewicht 680, R. liesklier twijfelachtig.
 26/3 Gewicht 700, R. liesklier twijfelachtig.
 1/7 Gezond gebleven.
 Pleit deze proef voor zoogdier-t.b.c.-bac.? NEEN.
- Cavia No. 58.
- 1936
 34 19/5 Ingespoten intraperitoneaal.
 23/5 Gewicht 280, geen verschijnselen.
 9/6 Gewicht 310, geen verschijnselen.
 7/7 Gewicht 380, geen verschijnselen.
 2/9 Gewicht 520, geen verschijnselen.
 29/12 Gewicht 670, geen verschijnselen.
 1937
 29/1 Gewicht 680, geen verschijnselen.
 26/3 Gewicht 700, geen verschijnselen.
 10/4 Gewicht 700, liesklier twijfelachtig te voelen.
 1/7 Gezond gebleven.
 Pleit deze proef voor zoogdier-t.b.c.-bac.? NEEN.
- Cavia No. 59.
- 1936
 35 19/5 Stam Sidik bilabsces.
 25/5 Gewicht 320, geen verschijnselen.
 9/6 Gewicht 340, geen verschijnselen.
 7/7 Gewicht 420, geen verschijnselen.
 2/9 Gewicht 500, geen verschijnselen.
 24/9 Gewicht 540, klieren twijfelachtig te voelen.
 24/10 Gewicht 585, klieren beiderzijds te voelen.
 7/1 Gewicht 550, klieren beiderzijds te voelen.
 1937
 10/4 Gewicht 650, klieren beiderzijds te voelen.
 26/5 Gedood. Long, lever, milt normaal, klieren geen zuurvaste bacillen.
 Pleit deze proef voor zoogdier-t.b.c.-bac.? NEEN.
- Cavia No. 60.
- 1936
 36 19/5 Cultuur Sidik van longmateriaal.
 Subcutaan en intramusculair in de R. achterpoot ingespoten.
 23/5 Gewicht 320, geen afwijkingen.
 9/6 Gewicht 340, R. liesklier klein te voelen.
 7/7 Gewicht 380, R. liesklier klein te voelen.
 31/7 Gewicht 410, R. liesklier doorgebroken, zuurvaste bacillen +
 2/9 Gewicht 420, wondopening genezen.
 24/9 Gewicht 350, zeer ziek.
 25/9 Gestorven. Tuberkels in de longen, milt en lever.
 Plei deze proef voor zoogdier-t.b.c.-bac.? JA.

Cavia No. 61.

1936

- 37 19/5 Cultuur Sidik van longmateriaal.
Subcutaan en intramusculair als cavia No. 60.
- 23/5 Gewicht 320, geen verschijnselen.
- 9/6 Gewicht 350, R. liesklier te voelen.
- 7/7 Gewicht 400, R. liesklier; er komt pus uit.
- 30/7 Gewicht 470, R. liesklier; er komt pus uit.
- 2/9 Gewicht 410, R. liesklier; er komt pus uit.
- 16/9 Gestorven met tuberkels in de longen, lever en in de vergroote milt.
- Plei deze proef voor zoogdier-t.b.c.-bac? JA.

Cavia No. 62.

1936

- 38 19/5 Cultuur Sidik van longmateriaal.
Ingespoten intraperitoneaal.
- 23/5 Gewicht 330, geen verschijnselen.
- 9/6 Gewicht 320, geen verschijnselen.
- 7/7 Gewicht 370, geen verschijnselen.
- 30/7 Gewicht 320, geen verschijnselen.
- 30/7 Gewicht 320, geen verschijnselen.
- 11/8 Gestorven met tuberkels in de longen en lever. De milt is 10,8 gr.
- Plei deze proef voor zoogdier-t.b.c.-bac? JA.

Cavia No. 63.

1936

- 39 19/5 Cultuur Sidik van longmateriaal.
Ingespoten intraperitoneaal als cavia 62.
- 23/5 Gewicht 300, geen verschijnselen.
- 9/6 Gewicht 310, geen verschijnselen.
- 7/7 Gewicht 380, geen verschijnselen.
- 21/7 Gestorven. Milt en lever vergroot, retroperitoneale klieren veretterd, zuurvaste bacillen positief, hiervan een cultuur verkregen.
- Longen geen afwijking gevonden.
- Plei deze proef voor zoogdier-t.b.c.-bac? JA

Vergelijkende proef met een t.b.c. bacillen stam.

Cavia No. 195.

1933

- 40 7/11 Intraperitoneaal ingespoten met t.b.c. bacillen van een stam
(reeds lang in het Afd. Laboratorium geïsoleerd).
- 7/11 Gewicht 230, geen verschijnselen.
- 4/12 Gewicht 290, geen verschijnselen.
- 1934
- 31/3 Gewicht 420, op entplaats infiltraat; L. liesklier te voelen.
- 7/2 Gewicht 410, op entplaats infiltraat; lieskl. beiderzijds te voelen.
- 14/3 Gewicht 430, op entplaats infiltraat; liesklieren vergroot.

- 4/5 Gewicht 460, ziek.
 16/5 Gewicht 370, zeer ziek.
 23/5 Gewicht 360, zeer ziek.
 23/5 Gewicht 360, zeer ziek.
 29/5 Gestorven. De longen met tuberkels; lever geen tuberkels te zien. Milt vergroot, geen tuberkels gezien; testis met abscessen, die naar buiten doorbreken.
 Retroperitoneale klieren vergroot.
 Microscopisch: testis, lever, long zuurvaste bacillen positief; milt negatief.

III. Beschouwingen in verband met de klinische-, pathologisch-anatomische- en bacteriologische bevinding.

Wat leert ons deze proevenreeks?

Groote hoeveelheden zuurvaste bacillen in de pus uit het bilabsces subcutaan en intramusculair bij een cavia ingespoten, zijn slechts in staat bij dit proefdier een infiltraat tot stand te brengen op de entplaats met vorming van een absces (verkazing), dat soms naar buiten doorbreekt. De regionale lymphklieren worden ook aangedaan, ze zwellen op, doch deze ontsteking gaat na 6—10 weken terug. Dus de infectie breidt zich niet verder uit, doch is slechts gelocaliseerd op de entplaats. In de lymphklier, die, na gezwollen te zijn, kleiner is geworden d.i. 8 weken na de enting, zijn microscopisch geen zuurvaste bacillen gevonden.

Dit verloop ziet men ook bij de enting van cavia's met groote hoeveelheden zuurvaste bacillen van de cultuur uit het bilabsces verkregen. Na een observatietijd van 1 jaar lang blijven de cavia's gezond zonder afwijkingen te vertoonen in de longen, lever, milt, mesenteriale- en retroperitoneale klieren.

De bacillen cultuur Sidik is niet virulent te krijgen na herhaalde passages door cavia lichaam.

Hieruit is te concluderen, dat het heel onwaarschijnlijk is, dat deze bacillenstam behoort tot de gewone t.b.c.stam van humaan type. Noch is hij te identificeeren met het bovine type, daar hij ook niet pathogeen is voor konijnen bij subcutane, intraperitoneale en bij intraveneuse injectie. Pas als de bacillen in steriele boter gesuspenseerd intraperitoneaal ingespoten zijn, zijn ze in staat het konijn te dooden en wel na 23½ maand. Noch hebben wij hier te doen met het aviaire type van een t.b.c.stam, want de kippen intraveneus ermede ingespoten, blijven heel gezond. Bovendien is hij ook niet pathogeen voor de witte rat, wat men kan verwachten van de vogel t.b.c.bacillen. Aan den anderen

kant is hij wel in staat een witte muis te dooden met vorming van een paar knobbeltjes lijkende op tuberkels in de long, echter zonder vuurvaste bacillen. Doch zoo virulent is hij voor de witte muis schijnbaar niet, want het proefdier stierf pas 15 maanden na de enting. Deze passage door de witte muis verhoogt de virulentie van den stam Sidik, zooals te zien is uit de proef bij de cavia (proef No. 25), die na de enting met longmateriaal van de gestorven muis, nu ook ziek wordt met knobbeltjesvorming in de longen en lever.

Dan zijn nog de andere eigenschappen van de bacillen stam Sidik vermeldenswaard, indien men deze micro-organismen inspuit bij andere dieren.

De mac. cynomolgus reageerde bij enting subcutaan en submuceus in de neus slechts met een plaatselijke vorming van een filtraat, dat later verdween, terwijl de aap verder gezond bleef.

Gevoeliger is de zwarte aap (*Semnopithecus maurus*). Wordt de bacil submuceus in de neus ingespoten, dan infecteert het micro-organisme in een betrekkelijk korten tijd van minder dan 2 weken, de lymphklieren van de onderkaak van de hals en ten slotte de bovenkwab van de longen. Hier ontwikkelt de infectie zich tot lobaire pneumonie, waaraan de aap succombeerde.

Wordt de aap subcutaan in de buik ingespoten dan ontwikkelt zich op de entplaats een plaatselijke ontsteking met vorming van verkazing. Verder breidt de infectie zich uit naar de lymphklieren langs den wervelkolom, die flink gezwollen zijn, vergroeien met elkaar tot pakketten, die later ook overgaan in verkazing.

Mechanisch veroorzaken ze een druk op de zenuwstammen, waardoor verlammingen ontstaan.

Na de proevenreeks verricht te hebben met het materiaal van het bilabsces en de cultuur hieruit verkregen, hebben wij het sputum van Sidik, dat ook zuurvaste bacillen bevatte, eveneens in cavia ingespoten.

Het sputum werd fijnverdeeld in 2 deelen zwavelzuur van 5%, daarna gecentrifugeerd; de vloeistof werd weggezogen, terwijl het neerslag weer gesuspendeerd wordt in zoutsolutie, na neutraliseeren wordt het materiaal in de proefdieren ingespoten. Hier volgen wij derhalve de methode van Hohn.

Een cavia subcutaan en intramusculair en twee cavia's

intraperitoneaal geënt met het materiaal, vertoonden na 6—12 maanden geen verschijnselen, welke pleiten tegen de opvatting, dat wij hier te doen hebben met humane of bovine t.b.c.bacillen.

De longen en lieslymphklier van één der intraperitoneaal geënte cavia's, werden verwerkt en ingespoten in cavia No. 135. Het resultaat hiervan was, dat de laatste cavia toch na 8 maanden afwijkingen in de longen, lever, milt en lymphklieren als bij t.b.c. kreeg.

De virulentie verhooging voor de cavia na één passage van een proefdier, die wij opgemerkt hebben bij den stam Sidik na een passage door een witte muis, verkrijgen wij hier met de proef met het sputum, met dit verschil dat hier de passage geschiedt slechts door een cavia.

Nu volgde de proef met de urine van Sidik, welke door Dr. R. Boentaran verricht werd. Uit het resultaat daarvan bij de proef No. 30 is te besluiten, dat de zuurvaste bacillen in de urine tegenover cavia de virulentie bezitten als die der gewone t.b.c.-bacillen.

Hierna verrichtten wij de proef met het longmateriaal van Sidik, waarbij de zuurvaste bacillen zonder passage de cavia tot sterven brachten, met verschijnselen en macroscopische veranderingen in de organen, welke aan t.b.c.cavia deden denken, met dit verschil dat hier de dood pas intrad 6 maanden na de inspuiting, ondanks het rijkelijk aantal bacillen dat ingespoten werd. Verder was te constateeren, dat de milt erg vergroot was tot een gewicht van 34,55 gr. In de literatuur wordt slechts vermeld dat bij de t.b.c.cavia de milt meerdere malen grooter kan zijn dan de normale, verder met of zonder tuberkels. Hier in het Afd. Laboratorium van Semarang weegt de milt van een normale cavia van 560 gram slechts 0,920 gram.

Het quantitatief verschil met de milt van de gewone t.b.c.-cavia volgens de literatuur is hier wel opvallend.

Wanneer wij de resultaten van de caviaproeven in overeenstemming brengen met het klinische beloop van de ziekte, dan krijgt men het volgende schema:

Phase	Klinisch beloop	Verrichte onderzoek met zuurvaste bacillen
I	Een leprageval type N ³ .	Zuurvaste bacillen in de neus.
II	De ontwikkeling van bilabsces met zuurvaste bacillen.	Een stam van zuurvaste bacillen gekweekt; volgens dierproeven is het hoogst onwaarschijnlijk, dat wij hier

- | | |
|---|---|
| <p>Röntgenonderzoek: Beencariës van os ilium.</p> | <p>te doen hebben met t.b.c. bacillen van zoogdieren of vogeltype.</p> |
| <p>III Patiënt kreeg long klachten; het sputum bevat zuurvaste bacillen. Röntgenonderzoek: afwijkingen in de long, in de vorm van egaal verspreide vlekjes.</p> | <p>De dierproeven wijzen er op, dat de zuurvaste bacillen voor cavia bij directe proeven niet virulent zijn; pas na passage zijn ze in staat een cavia te doden.</p> |
| <p>IV Patiënt kreeg haematurie met zuurvaste bacillen.</p> | <p>De zuurvaste bacillen in de urine hebben voor de cavia de virulentie als de gewone t.b.c. bacillen.</p> |
| <p>V Na de dood van patiënt Sidik Longen met caverne. Weefselonderzoek der longen nieren en lever; op t.b.c. ge-diagnostiseerd.</p> | <p>Het longmateriaal met zuurvaste bacillen, die voor cavia direct, zonder passage, virulent zijn als de gewone t.b.c. bacillen. De bacillen uit de cavia zijn in cultuur gebracht.</p> |

Bij het beschouwen van dit schema dienen wij uit te gaan van een door een ieder gehuldigde opvatting, welke als volgt geformuleerd kan worden: „Vertoont de long macroscopisch caverne en tuberkels, welke microscopisch bevestigd worden door het vinden van ronde infiltraten van lymphocyten, epithe-loide cellen en één of meerdere reuzencellen van Langhans, waarbij bovendien de cavia geënt met het longmateriaal sterft met verschijnselen als bij t.b.c., veroorzaakt door cultiveerbare zuurvaste bacillen, dan heeft men hier te doen met tuberculeuze long”.

Dit werd inderdaad gevonden bij de geseceerde longen van Sidik (sub. V). Hieruit volgt, dat de gecultiveerde bacillenstam van de cavia geënt met het longmateriaal volgens tot nu toe gehuldigde opvatting uit t.b.c.bacillen moet bestaan.

Op deze wijze geredeneerd, moeten de zuurvaste bacillen in de urine ook t.b.c.bacillen zijn geweest. (sub IV).

Doch de boven geformuleerde stelling gaat niet geheel op bij het onderzoek van het sputum van Sidik, omdat na directe enting daarmede de cavia gezond zijn gebleven. Pas na de passage worden de zuurvaste bacillen voor de cavia virulent. Deze proef doet ons denken aan de proeven van Calmette en zijn medewerkers (Valtis, Lacomme, van Deinse enz.), waar-medede ze het bestaan van filtreerbaar t.b.c.virus aannemelijk

trachten te maken. Doch het groote verschil tusschen de beide proeven is, dat de onderzoekers van de Fransche school zorgvuldig het te onderzoeken materiaal filtreeren, om de aanwezigheid van de gewone vorm van t.b.c.bacillen in het in te spuiten filtraat te vermijden, terwijl wij bij onze proeven juist groote hoeveelheden bacillen inenten. Dit feit maakt, dat het t.b.c.-karakter van de zuurvaste micro-organismen in het sputum twijfelachtig wordt. Bovendien dienen positieve passageproeven met de grootste reserve aanvaard te worden, daar volgens de Graaff, Flu en Römer, Feierabend en Rabinowitsch spontane cavia infectie met t.b.c.bacillen voorkomt.

Eveneens wordt de diagnose tuberkelbacillen uit het bilabsces heel onwaarschijnlijk, daar deze zuurvaste bacillen en die van de primaire pas geïsoleerde jonge culturen, niet in staat zijn om de cavia direct te doden.

Wel heeft Calmette zijn BCG., die ook de cavia niet tot succombeeren kan brengen; doch het is bekend, dat deze stam jarenlang op galhoudenden voedingsbodem is gecultiveerd, een kunstmatige bewerking, waardoor de stam gemitigeerd wordt.

Ongedwongen komen wij dan ook tot de opvatting, dat wij hier te doen hebben met 2 soorten zuurvaste bacillen n.l.:

a. een stam uit het bilabsces, niet direct dodelijk voor cavia.

b. een stam uit de geseceerde long, wel direct virulent voor cavia.

Deze opvatting trachten wij op de volgende wijze te bewijzen.

Wij nemen van even oude (1 maand) stam Sidik uit bilabsces en stam Sidik van de longen zooveel bacteriën, dat de suspensies in 5 cc zoutsolutie even troebel zijn. Voor elken stam nemen wij 2 cavia's, welke subcutaan intramusculair in de rechter achterpoot en 2 cavia's welke intraperitoneaal ieder met 1 cc van de bacillen suspensie ingespoten wordt. (zie proevenreeks C₃ volg No. 32 t/m No. 39 cavia No. 56 t/m No. 63).

Het resultaat, zooals uit de protocollen te lezen staat, is, dat de 4 cavia's ingespoten met de bacillenstam uit het bilabsces na een jaar nog in leven zijn, zonder algemeene ziekteverschijnselen te vertoonen, doch wel met lymphklier zwelling, terwijl de 4 cavia's ingespoten met den stam uit de long alle

6—8 maanden na de enting doodgaan met orgaanafwijking als bij de t.b.c.infecties.

Ook hier heeft een cavia een vergroote milt van 10 gr. gekregen met vlekkelig uiterlijk. Verder is vermeldenswaard, dat de microscopische veranderingen van de lever, milt en long anders zijn dan, wat men bij den mensch gewoonlijk vindt.

De beschrijving van het gevondene door Dr. G. A. van der Horst (Path. Anat. Afd. der C.B.Z.) is als volgt:

De *Lever* geeft uitgebreide haardjes van cellig geïnfiltreerd granulatiëwfs. te zien. Deze haardjes zijn wisselend van vorm (rond tot langwerpige strengen). Zij liggen vnl. aan de peripherie der leverkwabjes; soms precies ter plaatse van het periportale bindwfs. Er is nergens verkazing waar te nemen en ook reuzencellen type Langhans ontbreken. Hoogstens een aanduiding van een reuzencel van onregelmatig type. In deze haardjes van granulatiëwfs. komen kleine holten voor, welke doen denken aan de Virchowsche cellen der lepra; gedeeltelijk zijn dit vetcellen, doch zeker niet alle (Sudan-kleuring). Ik vind deze afwijkingen zeker niet typisch tuberculeus. Typische lepromeen zijn het echter ook niet.

Milt. Oedeem, stuwing, nekrose en bloedingen. Geen tb.afw.

Long. Conflueerende haarden van chronische bronchopneumonieën. Histologisch geen enkel aanknoopingspunt voor tb. (Geen tuberkels, verkazing en reuzencellen).

Ter vergelijking werden ook organen van een cavia, geënt met sputum van een t.b.c.patiënt en die van een cavia geënt met urine van een patiënt met nier-t.b.c., microscopisch onderzocht.

De verslagen der bevindingen zijn volgens Dr. van der Horst als volgt:

Cavia 152/1935 (tb. sputum)

Lever: Centrale stuwing. Diffuus bwf. toename en omgeschreven tuberkelstructuren: epithelioidcellen tuberkels, soms met reuzencellen, waaronder enkele typhische Langh. reuzencellen. Coms centrale verkazing. Levertb.

Long: Locale bronchopneumonieën van meer chronisch karakter. Geen typische tb.-structuren.

Milt: Stuwing, bloeding en nekrotische gedeelten, waarin geen bijzonderheden meer te herkennen zijn.

Cavia no. 50 geënt met t.b.c.urine.

Lever: diffuus bwf.vermeerdering, chron. ontsteking. Galgang woekering. Geen mooie tuberkels of Langh. reuzencellen.

Long: Acute etterige bronchitis. Chronische bronchopneumonieën, een enkel plekje van verkazing. Geen tuberkels. Wel reuzencellen maar niet mooi v/h type Langhans. De chronische afwijkingen i/d long kunnen wel van tb. aard zijn.

Milt: nekrotisch, misschien verkazing, doch dit is niet goed meer te herkennen.

Vergelijken wij de microscopische beelden der verschillende organen der cavia geënt met den bacillenstam uit de longen van Sidik en die der proefdieren geënt met tuberculeus materiaal (sputum, urine), dan merkt men onmiddellijk op, dat de histologische veranderingen veroorzaakt door de t.b.c.-bacillen in de longen, in de milt en in de lever hier niet typisch zijn zooals wel te verwachten is, zoodat volgens Dr. G. A. van der Horst de veranderingen in de organen der cavia geënt met zuurvaste bacillen uit de longen van Sidik, beschouwd kunnen worden nog te liggen in het kader der tuberculeuze processen. Deze onspecifieke histologische beelden in de longen bij de entcavia met virulente t.b.c.bacillen geïnfecteerd, zijn ook door E. Lauret en Caussimon waargenomen.

Daarentegen hebben wij in de literatuur de ongewone afwijkingen in de lever en in de milt nog niet ontmoet.

Ten overvloede hebben wij een cavia intraperitoneaal met t.b.c.bacillen ingespoten van een cultuur die reeds jaren is geïsoleerd. De cavia succombeerde 7 maanden na de enting met tuberkels in de longen, lever, testis en lymphklieren.

Het verschil in virulentie tusschen den bacillenstam uit het bilabsces en die uit de longen is wel heel duidelijk.

Kunnen wij met deze proeven tot de opvatting komen, dat wij een t.b.c.bacillen- en leprabacillen cultuur in onze hand hebben? Zou deze veronderstelling niet in strijd zijn met het klinisch beloop? En hoe zou de reconstructie van het geval zijn?

De nesteling van de zuurvaste bacillen, welke afkomstig zijn van het neusslijmvlies in de ontstane locus minoris resistentiae, als gevolg van de herhaalde injecties met aethyl ester chaulmograe kan ongedwongen aanvaard worden. Het feit van het apathogeen zijn der bacillen voor de cavia komt wel overeen met het resultaat van de onderzoekers, die de entproeven met lepramateriaal in cavia hebben verricht.

Onze proeven met het punctaat na het bilabsces werden dd. 29 Augustus 1932 verricht. Een maand daarna konden nog geen zuurvaste bacillen in het sputum aangetoond worden. In October 1932 werden in de longen Röntgenologisch vrij scherp begrensde, egaal verspreide vlekjes geconstateerd. Op 12 December 1932 waren in het sputum zuurvaste bacillen gevonden. Op 17 December 1932 werden 3 caviaproeven met het zuurvaste bacillen bevattende sputum verricht, doch de cavia's vertoonden geen verschijnselen behalve één die eerst een klein hard kliertje kreeg, dat later weer bijna verdween. Op grond hiervan zouden wij kunnen concludeeren, dat de patiënt Sidik in December 1932 longlepra had. In April kreeg de patiënt haematurie met zuurvaste bacillen. Op 13 April werd de caviaproef met de urine verricht en het ingespoten dier succombeerde ruim een maand later met t.b.c. verschijnselen.

Deze proef deed ons besluiten, dat de patiënt Sidik, die eerst lepra had, complicatie van nier-t.b.c. kreeg. In het verder beloop zou men zich kunnen voorstellen, dat de t.b.c.bacillen van uit de nier de longen infecteerden, waardoor na den dood het longmateriaal bij een cavia doodelijk was met verschijnselen als bij de t.b.c. Ook de macro- en microscopische veranderingen van de linkernier en de longen van den patiënt na den dood geconstateerd wijzen op een t.b.c.infectie.

Dit klinische beloop van een leprapatiënt, die later t.b.c. van de nier en daarna van de long als complicatie kreeg, klopt chronologisch geheel met de caviaproeven.

Voordat wij verder met deze zienswijze gaan, dienen wij ook in oogenschouw te nemen de andere mogelijkheden.

Wij zouden ons kunnen voorstellen, dat wij hier te doen hebben met t.b.c.bacillen, welke door de een of anderen invloed voor de cavia eerst avirulent waren (uit bilabsces), en die later in het beloop van de infectie virulenter werden (uit de geseceerde long). Deze veronderstelling is echter moeilijk te aanvaarden, immers hebben wij in de pathologie geen enkel voorbeeld, dat dezelfde ziektekiemen van een en denzelfden patiënt, doch op verschillende tijdstippen geïsoleerd een belangrijk verschil in virulentie vertoonen en dat het verschil na ruim 4 jaar cultiveeren ook nog blijft bestaan.

Derhalve is er niets tegen de opvatting, dat de virulente stam een t.b.c.bacillen stam is, doch de voor cavia avirulente

cultuur behoeft nog niet uit leprabacillen te bestaan. De tot nu toe verrichte proeven hebben ons dan ook slechts tot dit punt gebracht. Niettegenstaande dat, kunnen wij toch alvast concluderen, dat de voor cavia avirulente bacillen geen saprophyten zijn, omdat ze degelijk na passage door de witte muis pathogeen voor cavia te krijgen zijn en dat zij in staat zijn de zwarte aap (*Semnopithecus maurus*) te doden met vorming van pneumonie. In een ander geval veroorzaakt deze bacillenstam bij de zwarte aap een uitgebreide verkazing van lymphklieren.

Bij de tot nu toe gemaakte beschouwingen is nog niet ter sprake gebracht de resultaten van de cavia- en andere dierentingen met leprabacillen.

Jadassohn schrijft in het handboek van Kolle en Wassermann dat dierentingen met lepramateriaal reeds zeer vroeg zijn genomen met geheel negatieve resultaten, of slechts met een locale leproomvorming, of er ontwikkelden zich gedissimieerde ontstekingsproducten, die zich voordoen als bij dierlepra of als bij tuberculeuze aandoeningen. De meeste leprologen staan op een standpunt, dat lepra humana voor de gebruikelijke proefdieren niet overentbaar is. Ondanks het gebruik van entmateriaal zeer rijk aan bacillen kon noch Hansen, Koebner, Neiser, Leloir en noch Arning bij apen, katten, konijnen, cavia's, witte ratten en witte muizen positieve resultaten krijgen. De lijst der namen van onderzoekers, die geen resultaten hebben met entproeven zullen wij maar verder achterwege laten.

Tot de onderzoekers, die positieve entproeven bij dieren hebben, behoorden Damsch, die lepramateriaal in de voorste oogkamer van een konijn inspoot. De veranderingen, welke tot stand kwamen in de cornea, op de membraan van Descemet, aan de voorste lenskapsel, verder in de iris en ciliair lichaam, waarin leprabacillen houdende cellen te vinden zijn, beschouwde hij als entlepra in het oog.

Milcher en Ortman hebben dezelfde proeven nagedaan bij 3 konijnen en zagen behalve de veranderingen in de oogen ook ontstekingsproducten in de longen, de darmen en lymphklieren, die aan t.b.c.afwijkingen doen denken. Als verschil hiermede werd verder gevonden tumorachtige massa in de submucosa in de darm met verweeking en ulceratie. Doch deze veranderingen zouden ook kunnen ontstaan bij injectie met doode leprabacillen.

Thiroux heeft dezelfde uitkomst als Melcher en kon verder

uit het konijnmateriaal zelf een bacillencultuur kweken, die geleeke op t.b.c.bacillen en die ook pathogeen voor proefdieren was, zoodat Thiroux de vraag opwierp of het niet mogelijk zou zijn, dat de leprabacillen in het dierlijk lichaam over gaan in t.b.c.bacillen.

Marchoux kreeg bij inenting van witte ratten met lepra-materiaal afwijkingen gelijkende op die bij de rattenlepra.

T. Sugai kon Japansche dansmuisjes met menschenlepra regelmatig infecteeren. Er ontwikkelen zich granulomen bij intraperitoneale injectie vooral in de lever en lymphklieren. Verdere proeven bij 12 cavia's gaven als resultaat, dat bij 3 cavia's de entproef positief uitviel in dien zin, dat bij de eerste een granuloom gevonden werd aan de curvatura minor van de maag, ook in subperitoneaal weefsel en in het bindweefsel, van de entplaats; de tweede lobulaire pneumonische haarden vertoonde zonder zuurvaste bacillen en verder granulomen in pleura pulmonalis; de derde cavia kreeg granulomen in het mesenterium.

Entingen bij de apen gaven volgens Nicolle, Marchoux en Bourret, Kryle, Duval, Soule, Mc. Kinley en A. Mochtar, als resultaat slechts het ontstaan van een plaatselijk leproom, dat later verdween. De ontstane lepromen kunnen bij de proeven van Reenstierna 7 maanden blijven bestaan.

Bij de bestudeering van dit vraagstuk komt Jadassohn tot een uitspraak, dat de opvatting, als zoude men bij de vermeende positieve resultaten der entproeven te doen hebben met t.b.c., toch ook slechts een hypothese is, die nog bewezen dient te worden.

Nu is het de vraag, hoe moeten wij het resultaat van onze dierproeven en wel met het punctaat van het bilabsces en de cultuur daaruit gekweekt, bij die door anderen reeds verrichte, inpassen? (Verder worden de proeven met de urine, sputum, de long en de t.b.c.stam uit de long buiten beschouwing gelaten).

De eerste negatieve caviaproeven met het punctaat en cultuur uit bilabsces kloppen met die der onderzoekers, die negatieve entproeven hebben verricht.

De verhooging der virulentie der bacillen voor cavia na het passeeren van een witte muis doet denken aan de proeven van Thiroux, die als passageproefdier een konijn gebruikte.

Daarentegen verloopt de infectie bij de zwarte aap n.l

met pneumonie en verkaasde lymphklieren niet overeenkomstig de proef van één onzer (A. Mochtar) die slechts plaatselijk ontstane lepromen kreeg als resultaat van inenting van lepra-materiaal op het gezicht van zwarte apen.

Is derhalve de mogelijkheid niet uitgesloten, dat wij hier te doen hebben met een leprabacillen cultuur, dan kan als bezwaar tegen deze opvatting nog aangevoerd worden, het feit, dat de bacillen zoo gemakkelijk in cultuur gebracht konden worden. Dit feit is niet overeen te brengen met de vruchteloze pogingen van vele oudere onderzoekers, zooals Hansen, Neisser, Arning, Schottelus, Roux, Chantemesse enz. om dit microorganisme te kweken. Ook de tegenwoordige onderzoekers zooals Lowe en Eddy (de laatste onderzoeker gebruikt eventjes 58 verschillende soorten voedingsbodem om de leprabacillen in cultuur te brengen) kunnen geen resultaat boeken.

Sommigen daarentegen hebben bij hunne poging een bacteriëncultuur gekregen, waarvan het bewijs, dat deze werkelijk uit leprabacillen bestaan, nog verre van volledig is.

Zoo had ook van Houtum in Batavia in het jaar 1906 een bacillen cultuur, die bij contact met menschersera gelyseerd werd. Bij zijn verder onderzoek kon hij deze bacillen niet als leprabacillen erkennen.

De door Spronck, Zinoni, Karlinskes en Babes geïsoleerde diptheroiden konden niet voor de verwekker van de lepra aangezien worden. Ook de micro-organismen door Deycke geïsoleerd, waarvan de Nastin is bereid, worden door Deycke zelf niet beschouwd als de lepra-verwekker te zijn.

Anderen weer zooals Kedrowsky, Williams en Bayon hebben micro-organismen geïsoleerd, waarvan de zuurvastheid wisselend is, doch die bij konijnen tuberkelachtige ontsteking of granulomen doen ontstaan.

Reenstierna heeft ook een bacillenstam, die in staat is bij *Macacus rhesus*, lepra achtige ontstekingen te verwekken.

Dezelfde resultaten als Reenstierna hebben Clegg, Duval en Gurd met hun culturen gekregen.

In den laatsten tijd zijn ook berichten gelanceerd over het slagen van de poging om leprabacillen in cultuur te brengen. In 1929 publiceerde Shiga over zijn leprabacillencultuur op aardappelvoedingsbodem. In hetzelfde jaar gaf Schlossmann bericht over zijn gekweekte leprabacillen in bouillon van Martin na

maanden bebroeden. Ota en Sato maakten gebruik van de methode door Loewenstein aanbevolen n.l. het aanleggen van culturen uit het bloed van den patiënt. Ze hebben van 65 patiënten met lepra tuberosa 10 stammen van zuurvaste bacillen gekregen, waarvan 7 stammen geel (type auranticus) en 3 stammen wit (type albus) gekleurd zijn. Een andere stam afkomstig van een leproom gekweekt op den voedingsbodem van Petraghani kon bij de ratten de karakteristieke veranderingen teweeg brengen.

Mc. Kinley en Soule konden berichten dat de leprabacillen het best in een omgeving met 40% O₂ en 10% CO₂ groeien. Als cultuur media gebruikten zij aardappel-glycerine, hormoon-glycerine agar en eivoedingsbodem. Salle, later met Moser kweekt de leprabacillen in weefselculturen van kippen embryo; zij kregen behalve zuurvaste bacillen ook nog de niet zuurvaste diphtheroiden. Tot het verrichten van dierproeven met de gekweekte micro-organismen zijn zij nog niet gekomen.

Bergman, Sitanala en Sardjito hebben ook weefselculturen gebruikt om leprabacillen uit het bloed te trachten te kweken.

Ten slotte dient vermeld te worden het werk van Lampe en de Moor, die getracht hebben de bacillen van de rattenlepra te kweken. Deze onderzoekers hebben in het geheel 50 stammen van zuurvaste bacillen gekregen, doch zij beschouwden deze na verder vruchteloos experimenteren als culturen van saprophytische micro-organismen.

Tot dezelfde conclusie als Lampe en de Moor komt Essed ook, als hij een chromogene zuurvaste bacillenstam kreeg uit een punctaat van verweekt leproom.

Volgens het bovenvermelde kan men niet aan den indruk ontkomen, dat het aanleggen van leprabacillencultuur heel moeilijk is. Jadassohn komt tot een conclusie, dat het voorloopig nog niet gelukt is, met volkomen zekerheid en in praktisch bruikbare wijze, culturen van leprabacillen te verkrijgen.

Ook wij hebben de ondervinding dat het heel moeilijk is om culturen te krijgen uit lepromen of uit het bloed van patiënten met lepra-tuberosa. Herhaalde malen nemen wij materiaal van lepromen, al dan niet verweekt, zoo steriel mogelijk en enten op verschillende voedingsbodems voor t.b.c.bacillen, met of zonder toevoeging van sera van lepra-patiënten. Al onze pogingen

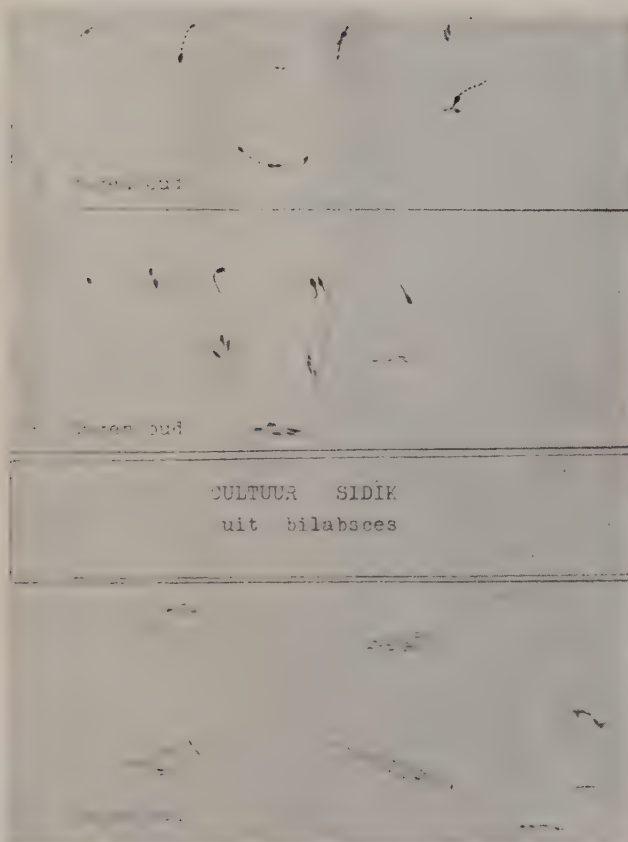
waren vruchteloos te noemen. Eén keer hebben wij van een leproom een chromogenen stam, door Essed gememoreerd, geïsoleerd, die wij niet als leprabacillencultuur beschouwen. Een andere maal hebben wij een cultuur van zuurvaste bacillen met vorming van globi gekregen, doch deze groeit zoo langzaam, dat er geen proeven daarmee te maken zijn. Daarentegen krijgen wij wel gemakkelijk een cultuur van punctaten van sommige patiënten. Dat is het geval geweest met de cultuur afkomstig van patiënt Sidik. Dan hebben wij een tweede cultuur van zuurvaste bacillen gekregen afkomstig van patiënt Sarko met de diagnose lepra nervorum type N₂ met positief bacillenonderzoek van het prikkelserum uit de oorlel. Hij werd behandeld met injectie van hydnocarpus olie en was vooruitgaande. Op 21 October 1932 kwam een onderhuidsche absces op, aan den medialen kant van den linkervoet ter hoogte van het eerste metatarsaal been. Het punctaat van het abscesje bestond uit dik geelwit pus, die microscopisch geen zuurvaste bacillen bevatte. De patiënt vertoonde klinisch en röntgenologisch geen t.b.c.-verschijnselen.

De pus werd uitgestreken op Lubenau voedingsbodem, die later een groei van zuurvaste bacillen vertoonde, lijkende op t.b.c.bacillen cultuur.

Een derde cultuur van zuurvaste bacillen was afkomstig van patiënt Soekiban lijdende aan lepra mixa type N₂C₁ met leprabacillen in het neusslijm. Het punctaat was afkomstig van een verweekte lymphklier van den hals onder den linkerkaakhoek. De patiënt heeft geen verschijnselen van t.b.c. De vierde cultuur is ook uit een punctaat van een verweekt lymphoom aan de linkerzij van den hals bij patiënt Tan A.Y., die leed aan lepra tuberosa type C₂ met lepra bacillen in neussceet, prikkelserum en bloeddruuppel. Microscopisch zat het punctaat vol zuurvaste bacillen.

Uitgebreide proeven met de stammen Sarko, Soekiban en Tan A. Y. hebben wij nog niet verricht. Wel kunnen wij constateeren, dat stam Tan A. Y. wel pathogeen is voor cavia zooals de stam Sidik uit de longen. De cavia krijgt behalve tuberkelachtige veranderingen in de longen en lever ook sterk vergrootte milt met bont uiterlijk. Vier cavia's niet zwaarder dan 430 gr., gestorven na enting met stam Tan A. Y. kregen vergrootte milten van 4,5 gr., 3,45 gr., 18 gr. en 21 gr., terwijl een normale cavia

51
18
17



van 560 gr. een milt van 0,920 gr. en een cavia van 250 gr. een milt van 0,250 gr. heeft.

Toch dienen de zuurvaste bacillenstammen, verkregen uit punctaten van lymphklieren (in ons geval halslymphklieren) heel kritisch bekeken te worden, omdat volgens Mc. Coy, Philippon en Sternberg, Mitsuda en Kobayashi het tegelijk voorkomen van lepra en t.b.c.bacillen in deze klieren niet zeldzaam is.

Op grond van de boven verrichte dierproeven en beschouwingen komen wij tot de conclusie, dat de zuurvaste bacillensam gekweekt uit het bilabsces van Sidik niet behoort tot de t.b.c.bacillen (type humane, bovine, aviaire) noch tot de saprophytische zuurvaste bacillenstammen; de mogelijkheid is niet uitgesloten, dat de cultuur uit leprabacillen bestaat.

(Slot volgt).

ANTONIE VAN LEEUWENHOEK

NEDERLANDSCH TIJDSCHRIFT VOOR HYGIËNE,
MICROBIOLOGIE EN SEROLOGIE

verschijnt driemaandelijksch.

PRIJS PER JAARGANG fl. 8.50.

Men abonneere zich door den Boekhandel of bij de Uitgevers
N.V. SWETS & ZEITLINGER, Boekhandel en Uitgevers Maats-
schappij Keizersgracht 471, AMSTERDAM

Alle stukken, de redactie betreffende, zijn te richten aan Prof. Dr. W. C. DE
GRAAFF, Prins Hendriklaan 73, UTRECHT.

Den schrijvers wordt verzocht hun manuscripten geheel persklaar, zooveel
mogelijk in machineschrift geschreven, in te zenden.

Mededeelingen aangaande advertenties, verzending, adresverandering en
dgl. aan de Uitgevers.

ANTONIE VAN LEEUWENHOEK

NEDERLANDSCH TIJDSCHRIFT VOOR
HYGIËNE, MICROBIOLOGIE EN SEROLOGIE

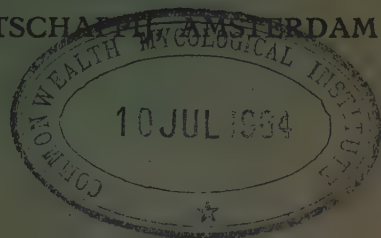
Orgaan van de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie



Onder redactie van Prof. Dr. W. C. DE GRAAFF, Hoogleeraar a. d. Rijksuniversiteit
te Utrecht en Dr. W. Aeg. TIMMERMAN, Directeur van het
Rijks Instituut voor de Volksgezondheid te Utrecht.

Vaste medewerkers: Prof. Dr. L. DE BLIECK (Utrecht), Prof. Ir. B. VAN DER BURG
(Wageningen), J. P. BIJL (Utrecht), Dr. W. DOORENBOS (Alexandrië), Prof. Dr. P. C.
FLU (Leiden), Dr. T. FOLPMERS (Rotterdam), Dr. J. A. VAN HASSELT (Amsterdam),
Dr. J. VAN DER HOEDEN (Utrecht), Prof. G. KAPSENBERG (Groningen), Prof. A. KLEIN
(Den Haag), Prof. Dr. A. J. KLUYVER (Delft), Prof. Dr. J. J. VAN LOGHEM (Amsterdam),
Dr. P. A. MEERBURG (Bussum), Dr. S. L. SCHOUTEN (Utrecht), Prof. Dr. W. A. P.
SCHÜFFNER (Amsterdam), Prof. Dr. J. SMIT (Wageningen), A. J. VITRINGA (Amsterdam),
Prof. Dr. JOH^a WESTERDIJK (Baarn), Prof. L. K. WOLFF (Utrecht).

N.V. SWETS EN ZEITLINGER
BOEKHANDEL EN UITGEVERSMAATSCHAPPIJ AMSTERDAM



INHOUD.

	Blz.
1. DR. H. J. VAN NEDERVEEN, Professor Doctor D. A. de Jong-Stichting	259
2. DR. H. J. VAN NEDERVEEN, Professor Doctor D. A. de Jong-Stichting, Verslag over de verrichtingen en den toestand over het jaar 1937 .	260
3. DR. J. W. DE WAAL, Eischen voor de samenstelling van consumptie- melk	261
4. DR. A. W. POT, Heeft de indeeling van de Flexnergroep der dysenterie- bacillen volgens Andrewes en Inman epidemiologische beteekenis? .	279
5. DR. JAC. JANSEN, Over enkele enzoötiëen veroorzaakt door <i>S. typhi-</i> <i>murium</i>	286
6. DR. SARDJITO en DR. A. MOCHTAR, Een poging tot het cultiveeren van lepra-bacillen (Slot)	294
6. BOEKAANKONDIGING	331

Professor Doctor D. A. de Jong-Stichting.

Beheerders der Prof. Dr. D. A. de Jong-Stichting geven hierbij kennis, dat zij hebben besloten gelden beschikbaar te stellen, teneinde de uitvoering van een onderzoek, behoorend tot het gebied der vergelijkende ziektekunde, voor rekening der Stichting mogelijk te maken.

Zij, die hiervoor in aanmerking wenschen te komen, worden uitgenoodigd zich vóór 1 Mei a.s., onder mededeeling van den aard van het te behandelen onderwerp en overlegging van een kort werkplan, zoo mogelijk met eene begrooting der kosten, aan te melden bij den secretaris.

Namens beheerders;

PROF. Dr. R. DE JOSSELIN DE JONG,

Voorzitter

Dr. H. J. VAN NEDERVEEN,

(Neuhuyskade 61, 's-Gravenhage)

Secretaris-Penningmeester.

DRIEBERGEN

's-GRAVENHAGE, Februari 1938.

Professor Doctor D. A. de Jong-Stichting.

Verslag over de verrichtingen en den toestand over het jaar 1937.

Het onderzoek van Dr. Schlemper over den z.g. „filtreerbaren vorm” van den tuberkelbacil werd ook in 1937 voortgezet. Aan het einde van het verslagjaar waren de laatste series proefnemingen aan den gang, waarmede dan het experimenteel gedeelte dezer onderzoekingen zal zijn afgesloten.

In het aantal en het bedrag der vaste bijdragen kwam geen verandering. Echter ging de opbrengst uit effecten door onvermijdelijke conversies in lager rentende obligaties niet onbelangrijk achteruit, terwijl voor het jaar 1938 met een nog aanmerkelijk lagere renteopbrengst rekening zal moeten worden gehouden.

Door verdere koersstijging steeg de waarde van het effectenbezit met *f* 241.26, waarna het totale vermogen der Stichting — met een gelijk gebleven kapitaal, nominaal groot *f* 17.500 — op 1 Januari 1938 bedroeg *f* 18.048,85.

Prof. De Graaff, die met ingang van 1938 aan de beurt van aftreding was, werd herbenoemd, zoodat er in het college van beheerders geen verandering kwam en ook voor dat jaar bestaat uit de heeren Prof. Dr. R. de Josselin de Jong, Voorzitter; Prof. Dr. W. C. de Graaff; Dr. J. van der Hoeden; Prof. C. F. van Oyen en Dr. H. J. van Nederveen (Neuhuyskade 61, 's-Gravenhage), Secretaris-Penningmeester.

De Secretaris,

H. J. VAN NEDERVEEN.

's-Gravenhage, Maart 1938.

Eischen voor de samenstelling van consumptiemelk

DOOR

Dr. J. W. DE WAAL.

Hetgeen hierna volgt handelt over de eischen, welke in Nederland aan consumptiemelk kunnen en moeten worden gesteld, ten opzichte van het gehalte aan vet en aan vetvrije droge stof.

De Codex Alimentarius, No. 1, Melk, uitgegeven in 1907, zegt onder Beoordeeling, blz. 20: „Voor menschelijk gebruik „bestemde melk moet zijn melk, waaraan niets is toegevoegd of „onttrokken, moet afkomstig zijn van gezonde en doelmatig „gevoederde koeien, welke vóór minstens 7 dagen gekalfd „hebben, en moet voorts voldoen aan de hieronder omschreven „eischen van deugdelijkheid, zoowel wat betreft de samenstelling „als den toestand.

„Melk kan slechts dan deugdelijk van samenstelling worden „geacht, indien zij de voedingswaarde heeft van wat voor een „bepaalde streek in een bepaalden tijd als normale melk (zie „overigens de gegevens op pag. 28) moet worden aangenomen. „*Ondeugdelijkheid van samenstelling* blijkt derhalve uit een voor „normale melk te laag gehalte aan een of meer der in de melk „voorkomende voedingsstoffen; zij wordt *veelal* veroorzaakt „door toevoeging van water of tapmelk, resp. door ontrooming, „maar kan ook voorkomen in de laatste periode van den staltijd „(Aprilmelk) of het gevolg zijn van onvoldoenden voedings- „toestand, van sommige ziekten, van de lactatieperiode van het „vee en van andere, nog slechts onvoldoend bekende om- „standigheden.”

De Codex zegt daarna op blz. 21: „Rekening houdende met „deze overwegingen moet men op grond van hier te lande „verkregen ervaringen in elk geval melk ondeugdelijk van „samenstelling achten, indien het gehalte aan vetvrije vaste stof

„lager is dan 8.0 % of indien het vriespunt dichter bij het nulpunt „ligt dan -0.54° C. of indien het percentisch vetgehalte harer „droogrest minder bedraagt dan

24.0 bij een vetvrije droogrest van minstens 8.0 procent.

23.5 „ „ „ „ „ „ 8.2 „ .

23.0 „ „ „ „ „ „ 8.4 „ .

22.5 „ „ „ „ „ „ 8.5 „ .

De 2e Aangevulde druk van den Melk-Codex is gelijk aan den eersten, wat betreft de punten in bespreking. Aangaande de toegepaste beginselen is van den 3den Aangevulden Druk hetzelfde te zeggen. Deze verhoogt echter de eischen aan het vetgehalte gesteld. Melk wordt door dezen, laatst uitgekomen druk (1920) in elk geval ondeugdelijk van samenstelling geacht indien het percentisch vetgehalte harer droogrest minder bedraagt dan 24.5 bij een vetvrije droogrest van ten minste 8.0 procent; 24.0 bij ten minste 8.3 procent; 23.5 bij ten minste 8.5 procent en 23.0 bij ten minste 8.8 procent.

Het voorgaande doet de meening kennen der zeer deskundige samenstellers van de opeenvolgende drukken van den Codex. Zij wenschen als consumptiemelk, en daarom gaat het, het natuurproduct, dus „melk zóó van de koe”. Dit is wel begrijpelijk. De strijd voor goede consumptiemelk is ingezet met een aanval op de gebruikelijke wijzen van vervalsching: de toevoeging van water, of de verlaging van het vetgehalte, door menging met taptemelk of door ontrooming. Maar reeds in 1907 had men de onmogelijkheid ingezien van het volstrekt doorvoeren van den vooropgeschoven wensch. Melk „zoo van de koe”, het natuurproduct, is niet steeds deugdelijk van samenstelling. Hiervan mag slechts worden gesproken, indien de melk voldoet aan zekere eischen ten opzichte van de voedingswaarde; voor een bepaalden tijd en een bepaalde omgeving moet zij „normale” melk zijn. En verder gaande op dezen geheel juisten weg vordert de Codex (1920) in consumptiemelk tenminste 8.0 % vetvrije droge stof en 2.6 % vet.

Inderdaad vordert de 3e Druk van den Codex een vetgehalte van ten minste 2.6 % in consumptiemelk. Dit blijkt bij het omrekenen van het tabelletje op blz. 19. Waarom de eenvoudige en begrijpelijke eisch: minstens 2.6 % vet in de melk, door den Codex niet is gesteld, wordt niet opgehelderd. Men

kan iets vermoeden, maar daarbij blijft het. Dit is echter duidelijk, dat de opeenvolgende drukken van den Melkcodex aan consumptiemelk eischen stellen ten opzichte van het gehalte aan vet en aan vetvrije droge stof en dus een zeker percentage vaste stoffen eischen. Dit alles komt geheel overeen met de wijze, waarop de zuivelindustrie haar grondstof waardeert. Dit alles is ook klaar en begrijpelijk, want consumptiemelk is geen natuurproduct en komt nu eenmaal niet „zóó van de koe”. Het is een product van de consumptiemelk-industrie.

In 1925 komt het Melkbesluit en eischt ten minste 24.0 % vet in de droge stof der melk. Het Melkbesluit-1929 brengt hierin geen verandering.

De Warenwet-besluiten, zooals het Melkbesluit er één is, worden vastgesteld zonder openbare behandeling. Men zal dus in verschillende gevallen moeten gissen op welke gronden eenig voorschrift berust. Ook de desbetreffende literatuur geeft hierin niet steeds de noodige opheldering. Een dergelijk raadseltje doet zich nu voor bij den eisch omtrent het percentage vet in de droge stof, hiervoor genoemd.

Door den Melkcodex wordt voor consumptiemelk een product gevorderd met een normale voedingswaarde; dit is een juist standpunt. Normaal is dan te noemen hetgeen de Codex hieronder verstaat en wat in de voorgaande regelen reeds is weergegeven. Bij de toepassing van dit beginsel eischt de Codex een zeker percentage vet én een zeker percentage vetvrije droge stof. De vraag mag worden gesteld, of het Melkbesluit, eischende een zeker percentage vet in de droge stof, aan de consumenten ook een „normale” melk verzekert. Want om het belang der consumenten gaat het ten slotte en niet om een meer of minder gemakkelijke handhaafbaarheid van een of andere bepaling of besluit, b.v. het Melkbesluit.

Melk is niet uitsluitend en zelfs niet in de eerste plaats te waardeeren om haar vetgehalte. De vetvrije droge stoffen: de dierlijke eiwitten, de melksuiker, de zouten, hebben minstens evenveel beteekenis in dit voedingsmiddel. Eischen aan de voedingswaarde van melk gesteld moeten met de beteekenis der vetvrije droge stof volledig rekening houden. Dit geschiedt indien eischen worden gesteld op de wijze zooals de Codex dit doet, zij het dan ook ten opzichte van het vetgehalte op een duidelijke, niet verborgen wijze. Dit geschiedt niet door het

als voedingsmiddel in de bijgevoegde figuur in teekening gebracht. Bij de bespreking daarvan zal worden uitgegaan van de aanname, dat normale melk in Nederland ten minste 2.8 % vet en tenminste 8.0 % vetvrije droge stof dient te bevatten. Het noemen van deze, voor de bespreking wel bruikbare cijfers, heeft geen ander doel, dan het vastleggen van een punt van uitgang.

Neemt men de voorloopig genoemde eischen aan, dan liggen alle voor de consumptie toegelaten melken in het rechter bovenkwadrant der teekening. Zij liggen dus rechts van de verticale 2.8%-vetlijn en boven de horizontale 8.0%-vetvrije-droge-stoflijn. Het uitgangspunt is bruikbaar, omdat in geheel Nederland de consumptiemelk zal kunnen voldoen aan de daarbij gestelde eischen. Deze liggen, en dat is noodzakelijk, beneden de gemiddelde samenstelling der Nederlandsche melk. De eisch van ten minste 8.0% vetvrije droge stof is reeds in 1907 gesteld door den Codex. Deze eischte in 1920 slechts 2.6% vet, maar in het algemeen is de samenstelling der melk sindsdien vooruit gegaan, zoodat nu zonder twijfel 2.8% vet mag worden gevraagd. Dit zal nader blijken.

Beschouwt men de naar rechts hellende lijnen der grafiek, welke betrekking hebben op melken met een zeker percentage vet in de droge stof, dan blijken deze geen goede scheiding te brengen tusschen de toelaatbare en de niet toelaatbare melken. De eisch van het melkbesluit: 24.0% vet in de droge stof, sluit nog aanvaardbare melken uit. Bij voorbeeld die met meer dan 2.8% vet en nagenoeg 9.0% andere voedingsstoffen. Dit type melk is echter niet het meest voorkomende. Van meer betekenis is het toelaten door het Melkbesluit van vele minderwaardige melken. Deze zijn te vinden in den driehoek, gevormd door de verticale 2.8%-vetlijn, de schuine 24.0-vetlijn en de onderzijde der figuur. Melk met 7.0% vetvrije droge stof en 2.3% vet, in 1907 door den Codex reeds ondeugdelijk geacht, voldoet nog aan den eisch van het Melkbesluit.

Vordert men meer vet in de droge stof, b.v. 25.0%, dan neemt het uitsluiten van goede melken een grooteren omvang aan, zooals uit de grafiek blijkt. De uitgesloten melken behooren reeds tot het veel voorkomende type. Daarnaast laat de 25.0%-veteisch minderwaardige melken door den beugel, zij het in mindere mate dan het in het Melkbesluit vastgelegde percentage. De toegelaten minderwaardige melken liggen in den driehoek

tusschen de verticale 2.8%-vetlijn, de schuine 25.0%-vetlijn en de onderzijde der figuur. In dezen driehoek vindt men melk met 2.4% vet en 7.1% vetvrije droge stof. Geen deskundige zal dit goede melk noemen.

Gaat men nog een hooger eisch stellen aan het vetgehalte in de droge stof, b.v. 27.0%, dan blijft het euvel der toegelaten minderwaardige melken. Deze zijn dan te vinden in den driehoek gevormd door de verticale 2.8%-vetlijn, de schuine 27.0%-vetlijn en de onderzijde der figuur. En tevens worden alle voor de consumptie zeer bruikbare melken uitgesloten, welke liggen links van de schuine 27.0%-vetlijn, rechts van de verticale 2.8%-vetlijn en welke meer dan 8.0% vetvrije droge stof bevatten. Uitgesloten worden dus veel voorkomende goede melktypen. Ter nadere bepaling der gedachte wordt nog een voorbeeld genoemd: niet toegelaten wordt melk met 3.2% vet en 8.8% vetvrije droge stof. Het is geheel onjuist een dergelijk goed product als consumptiemelk te weren.

De calorische waarde van de melk, welke voor 100 g van dit voedingsmiddel in Nederland gemiddeld 60 bedraagt, is in de praktijk nimmer gebruikt voor het stellen van eischen aan consumptiemelk. De zuivelindustrie kent deze grootheid niet. In de teekening zijn de lijnen getrokken voor de calorische waarden 55 tot 60. Een eisch op deze waarde gegrond zou weder beneden het gemiddelde moeten liggen en b.v. kunnen worden gesteld op 57. Volgt men de daarbij behorende lijn, dan blijkt deze melk buiten te sluiten met meer dan 2.8% vet en meer dan 8.0% andere voedingsstoffen. Daarentegen wordt weer toegelaten naast melk met minder dan 2.8% vet en een goed gehalte aan vetvrije droge stof, ook melk met 7.1% dezer laatstgenoemde bestanddeelen en meer dan 3.2% vet.

Uit de hiervoor vermelde cijfers volgt nog een ander bezwaar tegen het stellen van een calorischen eisch aan melk. Daarbij wordt allicht gedacht, dat melken van b.v. 57 calorieën voor de voeding alle de zelfde beteekenis zullen hebben. Dit is echter geenszins het geval. Melk met het laatstgenoemde aantal calorieën kan 2.5% vet bevatten en 9.0% vetvrije droge stof, maar deze getallen kunnen ook zijn 3.2% en 7.3%. In het eerste voorbeeld is de melk meer waard met het oog op de dierlijke eiwitten; in het tweede is de waarde voor de vetvoeding grooter.

In de voorgaande uiteenzetting is de eisch van 57 calorieën

als voorbeeld gekozen, daar dit getal het meest aannemelijk is in vergelijking met het gekozen uitgangspunt: minstens 2.8% vet en 8.0% andere voedingsstoffen. Door het vragen van 58 calorieën wordt reeds weder goede consumptiemelk uitgesloten. Ook leidt het vorderen van een zekere calorische waarde tot het toekennen van een te groote beteekenis aan het vetgehalte der melk ten opzichte van de overige voedingsstoffen daarin. Dit is een gevolg van de groote calorische waarde van het vet, nl. 9.3 calorieën per gram, terwijl de vetvrije droge stof, na aftrek van 0.75% voor de zouten, slechts 4.1 calorie per gram levert.

Er is nog een vierde wijze, waarop aan melk eischen kunnen worden gesteld ten opzichte van de grof-scheikundige samenstelling. Gevraagd kan worden een zekere hoeveelheid droge stof, b.v. 11.0% of 12.0%. In de grafiek zijn de hierop betrekking hebbende lijnen niet aangebracht, met het oog op de duidelijkheid der teekening. Het zijn schuine lijnen met nog sterker helling naar links dan de calorielijnen. Nu ligt er wel iets aantrekkelijks in het eischen van een zekere hoeveelheid droge stof in de melk, daar deze een maat is voor de kosten en zorg, welke de veehouder zich, in welken vorm dan ook, heeft getroost. Maar ook de droge-stoflijnen blijken in hun schuine verloop geen goede scheiding te maken tusschen toelaatbare en niet toelaatbare melken. Ook kan bij eenzelfde percentage droge stof de verhouding tusschen het vet en de vetvrije voedingsstoffen zeer uiteengaan. Zoowel 2.2% vet en 8.8% vetvrije droge stof, als 3.5% en 7.5% der genoemde bestanddeelen geven als som 11.0% droge stof.

Alvorens over de grafiek nog meerdere opmerkingen te maken, dient eerst een ander punt te worden besproken.

Van de beide klassieke methoden voor het vervalschen van melk is de watertoevoeging licht te achterhalen en te onderdrukken. Hetzelfde kan niet worden gezegd van de verlaging van het vetgehalte, op welke wijze deze dan ook mag worden verkregen. Toch kunnen ook tegen dezen misstand wel maatregelen worden genomen. Het is echter niet mogelijk daarbij te volstaan met het eischen van het „natuurproduct, zóó van de koe”, wat de zuivelindustrie dan ook reeds jaren geleden heeft ingezien. Deze heeft in Nederland over de geheele linie de betaling der melk volgens het vetgehalte ingevoerd, op grond van zakelijke overwegingen. Maar deze wijze van betalen prikkelt den vee-

houder, die de melk aan de zuivelindustrie levert, of aan melkinrichtingen, of aan handelaren, voortdurend het vetgehalte der melk met alle daarvoor passende middelen op te voeren. En daarmee gaat dan ook de hoeveelheid vetvrije vaste stoffen omhoog; tusschen de hoeveelheid van ieder der vaste stoffen in de melk bestaat een zeker verband. Van Dam en Janse (1931) hebben omtrent deze correlatie vele gegevens verzameld, met name ten opzichte van de verhouding tusschen vet en caseïne. Ook Kestra (1936) verschaft vele gegevens.

Voor consumptiemelk staat de zaak echter anders. Deze wordt in den kleinhandel niet verkocht op gehalte. Zij behoeft slechts te voldoen aan den eisch van het Melkbesluit, zoolang een gemeentelijke verordening geen andere voorschriften geeft. Het Melkbesluit heeft blijkbaar rekening gehouden met de omstandigheid, dat in vele gevallen de consumptiemelk slechts kan voldoen, of tenminste slechts voldoet aan zeer matige eischen. Het maakt den indruk, dat bij het stellen van den zeer lagen eisch van 24.0% vet in de droge stof vooral is gedacht aan de kleine veehouders, waarbij het belang van den consument eenigszins in het gedrang is geraakt. Als deze laatste de juiste samenstelling kende van de hem aangeboden melk, dan zou hij in vele gevallen daarmee terecht geen genoegen nemen, ook al zou de waar voldoen aan het Melkbesluit. Hiervóór is reeds betoogd, dat een verhooging van 24.0% vet in de droge stof tot b.v. 27.0%, geen bevredigende verbetering kan brengen. De principieele fout blijft. Waar bij gemeentelijke verordening, krachtens artikel 15, onder 3, der Warenwet nadere eischen zijn gesteld aan de melk, daar heeft men dan ook de methode van het Melkbesluit niet gevolgd, maar een zeker percentage vet gevorderd in de *melk* en niet in de droge stof. Hierna volgt nu een overzicht der gemeenten, welke het aangegeven artikel der Warenwet hebben toegepast.

Amsterdam eischt in de maanden April—Augustus 2.7% vet in de melk; in Februari, Maart, September en October: 2.85% en in November, December en Januari: 3.0%.

's-Gravenhage heeft vrijwel dezelfde eischen in de bestaande verordening; deze wenscht men echter te wijzigen. Volgens berichten in de dagbladen wordt voorgesteld te eischen ten minste 27.0% vet in de droge stof. Tegen dit voorstel bestaat blijkbaar een sterke oppositie, ook in den gemeenteraad, met

het oog op de belangen van de kleinere bedrijven. Het voorstel heeft vooral ten doel de ontrooming tegen te gaan.

In de provincie Groningen wordt door 42 van de 57 gemeenten, waaronder alle grootere, behalve Hoogezand, en dus ook door vele plattelandsgemeenten, 3.0% vet geëischt in de consumptiemelk.

In het warenkeuringsgebied Alkmaar eischen meer dan 40 gemeenten, waarbij enkele grootere ontbreken, dus voornamelijk plattelandsgemeenten, minstens 2.75% vet.

Assen eischt ten minste 3.0% vet in de melk.

Amsterdam en 's-Gravenhage wijzigen hun eischen met de jaargetijden. In Groningen en in het warenkeuringsgebied Alkmaar en te Assen acht men het rekenen met de jaargetijden overbodig.

In sommige kringen wordt wel de meening aangehangen, dat aan kleinere melkers- en melkverkoopersbedrijven geringer eischen moeten worden gesteld dan aan meer omvangrijke. Toepassing heeft dit beginsel nog niet gevonden. Dit is verheugend.

De houding in de landelijke keuringsdistricten Groningen, Alkmaar en in de eveneens landelijke gemeente Assen aangenomen, is begrijpelijk, als zij in alle jaargetijden hetzelfde percentage vet in de melk vragen. De betrokken gemeenten liggen in groote gebieden, waar zeer veel melk wordt gewonnen, voornamelijk voor industriele doeleinden. Hierop maakt de stad Groningen eenigermate een uitzondering. Deze ontvangt nog ongeveer 4 miljoen k melk, een belangrijk deel der benoodigde hoeveelheid, van ongeveer 80 consumptiemelkers, voor een deel nog in de gemeente zelve gevestigd. De productie van de consumptiemelk vormt in de genoemde gebieden, maar ook in Friesland en Drenthe, praktisch één geheel met die der industriemelk. Dit neemt niet weg, dat er nog wel consumptiemelkers zijn, maar aaneengesloten consumptiemelk-productiegebieden kent men niet. Ook is de consumptiemelker in vele gevallen leverancier eener zuivelfabriek. De consumptiemelk ondervindt als gevolg van den beschreven toestand een sterken invloed ten goede. Alle verbeteringen, welke worden toegepast op de productie en de behandeling van de industriemelk, waaronder begrepen de voorlichting der veehouders in hygiënische aangelegenheden, komen ten goede aan de consumptiemelk. Het is dan ook van zeer groot belang voor de melkgebruikers het daar-

heen te leiden, dat de productie van consumptiemelk niet wordt losgemaakt van die der industriemelk. De maatregelen ten bate van de laatstgenoemde genomen, hebben financieel en organisatorisch een veel breeder en sterker basis dan maatregelen ten opzichte van de consumptiemelk alléén.

En nu een groote stad, voorzien door een consumptiemelkgebied: Amsterdam. Hieromtrent is een uitvoerig rapport verschenen vastgesteld in Juli 1932, van een door den gemeenteraad in 1931 ingestelde commissie. Het „Rapport der Melkcommissie” aan Burgemeester en Wethouders van Amsterdam, is uitgegeven ter Stadsdrukkerij. De Melkcommissie werd in het leven geroepen teneinde, na jarenlang getob, verbetering te brengen in de melkvoorziening der hoofdstad.

Het is hier niet de plaats de Amsterdamsche melkvoorziening en haar geschiedenis te behandelen. Wel mag worden medegedeeld, dat de samenwerking van den warenkeuringsdienst, beschikkende over een veearts en stalcontroleurs, met een contrôlestation van de veehouders en een van de melkslijters, Meca en Meba, niet bij machte is geweest een goeden toestand te scheppen. De Melkcommissie stelt nu in haar rapport ver strekkende maatregelen voor ten einde voor Amsterdam te verkrijgen melk van goede samenstelling, met hygiënische voorzorgen gewonnen en gedistribueerd.

Aangeraden wordt een monopolistisch melkbedrijf, dat men zich denkt in handen van een naamlooze vennootschap, waarin de gemeente deelneemt voor 60%. De melk wil men koopen van de koemelkers in de omgeving van Amsterdam gevestigd; dat zijn er ongeveer 2500. Met deze veehouders zullen contracten worden gesloten met allerlei bepalingen omtrent de melkwinning. De betaling der melk zal geschieden volgens de hoedanigheid, waaronder óók het vetgehalte wordt verstaan. Hoe de prijs van de melk zal worden vastgesteld, laat het rapport in het midden. In een der bijlagen van het rapport wordt als grondslag voor de betaling de zuivelwaarde der melk genoemd. De Amsterdamsche commissie heeft dus zuiver aangevoeld, dat de consumptiemelk en de industriemelk bij de productie beide melk zijn, zonder meer. Het onderscheid ontstaat eerst bij de bepaling van de bestemming van het product.

Zij, de Melkcommissie, ziet trouwens geen mogelijkheid tot het verbeteren der, ook door haar als zeer slecht erkende toe-

standen bij de melkvoorziening der hoofdstad, zonder betaling der melk naar samenstelling en reinheid. De samenstelling der melk is wel in de eerste plaats afhankelijk van de hoedanigheid van het voor de melkwinning beschikbare vee. De bekende „schilleboeren” worden met name genoemd. Zooals reeds is medegedeeld eischt Amsterdam in den zomer slechts 2.75% vet in de melk. Deze bevat dan zeer waarschijnlijk minder dan 8.0% vetvrije droge stof, of nauwelijks dit percentage, in aanmerking genomen, dat de melk te Amsterdam van slijters betrokken, gemiddeld 27.5% vet in de droge stof bevat. (Enquête van de pharmaceutische Inspectie der Volksgezondheid in 1937). Melk met een zoo bescheiden gehalte aan vaste stoffen is te verwachten uit het gebied om Amsterdam, in aanmerking genomen de wijze waarop daarin het melkersbedrijf in het algemeen wordt uitgeoefend.

Men vindt om Amsterdam, in hoofdzaak althans, melkers die koeien, welke reeds een aantal malen hebben gekalfd, koopen voor weinig geld. Deze beesten worden dan nog één of twee jaren aangehouden om gemolken te worden. Daarna gaan zij naar de slachtbank en koopt hun eigenaar wederom een goedkoop koetje. Het hier beschreven melkvee levert „lang nat”, dat wil zeggen een groot aantal liters vocht met weinig vet en overige vaste bestanddeelen. Dit alles in tegenstelling met den veefokker, die zijn veestapel tracht te brengen op een zoo hoog mogelijk peil. Dit ook wat betreft de samenstelling van de melk, teneinde daarvoor als grondstof der zuivelindustrie een goeden prijs te kunnen maken. De productiekosten van dergelijke melk zijn begrijpelijkerwijze hooger dan die van het „lang nat” der schilleboeren. De goede melk van den veefokker kan, als consumptiemelk verkocht, niet concurreeren met die van den zoetboer, daar de straatverkoop der melk niet geschiedt op gehalte, maar eenvoudig per liter. Verbetering in dezen misstand kan niet worden gebracht door het Melkbesluit, dat te lage eischen stelt en dit bovendien nog doet volgens een ondoelmatige methode. Dit is reeds eerder gezegd.

Te 's-Gravenhage klaagt men over het ontroomen van de melk. Het is begrijpelijk, al is het ook niet goed te keuren, dat een handelaar aan door hem ontvangen melk, indien dit mogelijk is, zooveel vet onttrekt als de eischen betreffende het vetgehalte in consumptiemelk mogelijk maken. 's-Gravenhage vraagt in

den zomer in de melk 2.75% vet. De handelaar kan dus aan melk met 3.5% vet minstens 0.6% daarvan onttrekken, zonder met de gemeentelijke verordening in botsing te komen.

Eischt men een zeker percentage vet in de droge stof, dan blijft de mogelijkheid van het ontroomen bestaan, ook al wordt de berekening van de hoeveelheid vet, welke men aan de melk kan onttrekken, wat ingewikkelder. Maar deze hindernis kan door den belanghebbende gemakkelijk worden genomen. Een nadere beschouwing van de grafiek kan deze verhoudingen toelichten. Daaruit blijkt, dat aan melk met nagenoeg 8.5% vetvrije droge stof en 3.5% vet ongeveer 0.7% vet kan worden onttrokken; deze blijft dan nog meer dan 24.0% vet in de droge stof bevatten, zooals het Melkbesluit eischt. Verhoogt men den eisch tot 27.0% dan blijft voor melk met eveneens 8.5% vetvrije droge stof en 4.0% vet een ontrooming tot de veilige grens van 3.3% van dit laatstgenoemde bestanddeel mogelijk. Bij melken met een laag gehalte aan vetvrije droge stof blijken de omstandigheden voor den ontroomer nog meer voordeelig. Dit is ook het geval, indien in deze melken het vetgehalte wat lager ligt. Aan melk met 3.5% vet en 8.0% vetvrije droge stof kan nog 0.5% worden onttrokken, zonder te komen beneden 27.0% vet in de droge stof. De eisch van 27.0% vet in de droge stof verhindert de ontrooming in bepaalde gevallen dus niet.

Wat aangaat den calorischen eisch, deze laat een zeer sterke ontrooming toe. Dit blijkt zonder nadere toelichting onmiddellijk uit de figuur.

Ook het eischen van een zeker percentage droge stof maakt de ontrooming gemakkelijk en voordeelig en werkt deze dus in de hand.

De eenige oplossing voor alle moeilijkheden geeft het eischen van een zoo hoog mogelijk percentage vet in de *melk*, met daarnaast een minimum vetvrije droge stof.

De hiervoor uitgesproken meeningen zijn ook te vinden in de „Handelingen van het Genootschap ter bevordering van Melkkunde” 1928, II. Uit een daarin voorkomende mededeeling over „Standaardisatie van Melk” blijkt, dat de groote meerderheid der daar aan het woord zijnde deskundigen heil ziet in het eischen van een zoo hoog mogelijk vetgehalte. In het bijzonder mag hier het oordeel worden vermeld van professor Gorter, die wees op het groote belang voor de zuigelingen bij een constante

samenstelling van de melk. Beschouwt men nu nogmaals de grafiek dan is het duidelijk, dat het eischen van een hoog percentage vet én van een voldoende hoeveelheid vetvrije droge stof, als consumptiemelk slechts die toelaat, welke ligt in het rechter bovendeel der figuur. Hier vindt men niet slechts in het algemeen de beste melken, maar zij bezitten bovendien een samenstelling, welke weinig afwijkt van het gemiddelde voor de betere melken. De samenstelling is dus vrij constant.

In de aangehaalde Handelingen wordt door Veenbaas als eisch voor consumptiemelk genoemd, vooral ook met het oog op de mogelijkheden in Friesland, een vetgehalte van 3.2%. De directeur van den keuringsdienst van waren te 's-Gravenhage merkt, volgens de Handelingen, tegen het gevoelen der meerderheid op, dat het voorgestelde misschien in Friesland toepassing kan vinden, maar overigens vooral theoretische waarde heeft. Dit oordeel kan niet worden onderschreven. Toegegeven kan worden, dat het verbeteren van de toestanden op het gebied van de voorziening met consumptiemelk in het westen des lands met groote moeilijkheden gepaard zal gaan. Maar indien de juiste wegen worden bewandeld, zal verbetering mogelijk zijn. Overigens is het volkomen begrijpelijk, dat de directeuren der warenkeuringsdiensten in het genoemde landsgedeelte den moed wel eens verliezen. Zij kunnen inderdaad met de middelen, welke de Warenwet tot hun beschikking stelt, de noodige verbeteringen in een consumptiemelk-productiegebied niet verkrijgen. Zie Amsterdam.

Zooals hiervoor reeds is gezegd, zijn in een groot aantal gemeenten in de provincie Groningen verordeningen van kracht, welke minstens 3.0% vet eischen in de consumptiemelk. Men heeft ook in de hoofdstad der provincie, ondanks het bestaan van ongeveer 80 consumptiemelkers, dezen eisch kunnen doorvoeren; men was voor de melkvoorziening op de zoetboeren niet uitsluitend aangewezen. De „Stad” betreft meer dan de helft van de benoodigde melk uit een wijderen omtrek. Misschien zal de opmerking worden gemaakt, dat 3.0% vet voor de provincie Groningen een matig cijfer is. Dit is echter niet het geval. Toevalligerwijze zijn eenige gegevens bekend uit de gemeente Slochteren, waar ook 3.0% vet in de consumptiemelk wordt geëischt, maar waar men dit percentage voor eenige verhooging vatbaar achtte. Bij nader onderzoek kwamen echter de volgende cijfers voor het licht.

Gemeente Slochteren.

gemiddeld vetgehalte der melk aangevoerd aan
de zuivelfabriek te

jaar	Harkstede	Hellum	Slochteren
1933-34	3.19 %	3.28 %	3.23 %
1934-35	3.21 %	3.28 %	3.26 %
1935-36	3.23 %		3.30 %

Volgens het onderzoek van 126 monsters consumptiemelk in de gemeente Slochteren genomen door den warenkeuringsdienst in Groningen in 1935 bevatten

15 dat is ongeveer 12% een vetgehalte lager dan 3.0% ;

39 dat is ongeveer 31% een vetgehalte lager dan 3.25% ,

en de overige monsters meer dan 3.25%. In de zeer uitgestrekte gemeente, waarover het hier gaat, is de samenstelling der consumptiemelk vrijwel gelijk aan die der industriemelk. De eisch van minstens 3.0% vet zal hier niet kunnen worden verhoogd.

In de provincie Groningen zijn echter ook gebieden, waar de melk een hooger vetgehalte bezit dan in Slochteren. De warenkeuringsdienst geeft op als het gemiddelde vetgehalte der onderzochte consumptiemelk in de provincie, voor het jaar 1934-1935: 3.43% en in 1935-36: 3.42%. Deze gemiddelde vetgehalten zijn gelijk aan die van een groote zuivelfabriek in de buurt van Groningen, waar de gemiddelde vetgehalten der aangevoerde melk waren als volgt:

1934-1935: 3.426% en 1935-1936: 3.431%.

Uit de hiervoor vermelde gegevens, welke voor aanvulling vatbaar zijn, mag toch wel worden afgeleid, dat in de provincie Groningen een nauwe aansluiting is bereikt van consumptie- en industriemelk. De eisch van minstens 3.0% vet in de melk, welke bij de gegeven omstandigheden voor een verhooging over het geheele gebied nog niet vatbaar is, heeft zonder twijfel bijgedragen tot dit gunstige resultaat.

In Friesland heeft geen der gemeenten bij afzonderlijke verordening eischen gesteld aan melk. Het gemiddelde gehalte aan vet van de melk, aangevoerd aan de zuivelfabrieken op coöperatieven grondslag in dit gebied, heeft bedragen in

1933-1934: 3.44% ; 1934-1935: 3.48% ; 1935-1936 3.50%.

In Friesland zou dus zonder bezwaar meer dan 3.0% vet in de consumptiemelk kunnen worden gevorderd.

Voor Drenthe mag worden aangenomen, dat 3.0% vet in de consumptiemelk zonder bezwaar zal kunnen worden gevraagd. Dit is wel gebleken bij een onderzoek, ingesteld naar aanleiding van het tot stand komen van de gemeentelijke melkverordening voor Assen. Deze is reeds eerder vermeld.

Over het keuringsgebied Alkmaar, dat nagenoeg geheel Noordholland ten noorden van het IJ en het Noordzeekanaal omvat, kan het hierna volgende staatje eenige inlichtingen geven. De daarin vermelde gegevens zijn verschaft door een zuivel- en melkproductenfabriek. Zij hebben betrekking op de samenstelling der melk, door het bedrijf ingekocht als grondstof.

<i>Industriemelk.</i>	Gemiddeld	Minimum		Maximum	
vet in %	3.25	Juni	3.03	October	3.48
droge stof in %	11.69	April	11.50	October	12.02
vetvrije droge stof in %	8.47	Januari	8.40	Mei	8.57
vet in de droge stof in %	27.6	Juni	26.3	November	29.1

Van Dam en Janse, t.a.p., onderzochten de melk van 40 boerderijen in Noordholland, systematisch van November 1927, tot einde April 1928 en in het tijdvak Mei — einde October 1928. Van de 2080 onderzochte monsters bleken slechts negen een vetgehalte te bezitten lager dan 2.8%. Het winter- en het zomerhalfjaar vertoonden geen verschil. Neemt men de Noordholland-sche gegevens te zamen, dan blijkt de eisch van minstens 2.75% vet in de consumptiemelk, door verschillende gemeenten in het keuringsgebied Alkmaar gesteld, voor verhooging vatbaar.

Met het aangevoerde cijfermateriaal kan hier worden volstaan. Daaruit volgt wel, dat voor onderscheidene gebieden in Nederland een vetgehalte zal kunnen worden vastgesteld, hetwelk als minimum in consumptiemelk kan worden geëischt. Hierbij dient zoo nauw mogelijk te worden aangesloten bij het gemiddelde vetgehalte der melk, zooals deze wordt geleverd aan de zuivelfabrieken. Deze melk mag worden geacht te zijn wat het vee heeft voortgebracht. De gegevens der zuivelbedrijven

kunnen als basis voor het stellen van eischen worden gebruikt. Dit is niet het geval met de cijfers van de warenkeuringsdiensten, welke doorlopend slechts betrekking hebben op consumptiemelk, zooals deze ter aflevering aan gebruikers in voorraad is. Deze melk kan door allerlei handelingen der zoetboeren reeds verschillen van de industriemelk en bovendien bemonsteren de keuringsdiensten in den regel de minder vertrouwde melkverkoopers vaker dan de goed aangeschrevenen. Als gevolg van dit alles is het cijfermateriaal der keuringsdiensten voor doeleinden van wetgeving geen goede basis.

Te voorzien is de tegenwerping, dat vele kleine veehouders niet zullen kunnen voldoen aan eischen, welke de gemiddelde samenstelling der industriemelk dicht naderen. De melk uit stallen met een gering aantal koeien is te veel onderhevig aan toevallige afwijkingen, ook van een enkele koe. Daarnaast zijn de financieele omstandigheden van deze kleine veehouders dikwijls van dien aard, dat zij geen goed melkvee kunnen kopen of dit niet goed kunnen onderhouden. Het produceeren van melk met een onvoldoende hoeveelheid vaste stoffen, of een nauwelijks voldoende hoeveelheid daarvan, is dan wel het te betreuren gevolg, maar dergelijke melk kan toch nog dikwijls voldoen aan het Melkbesluit en is als consumptiemelk nog verkoopbaar. Bij het stellen van hoogere eischen aan de samenstelling van de melk zouden dergelijke bedrijfjes moeten verdwijnen.

Deze tegenwerpingen kunnen niet juist worden geacht. Indien kleine koemelkers uitsluitend melk voor de consumptie produceeren, moeten tegenover hunne belangen die van de verbruikers worden gesteld. Hierover is reeds een en ander gezegd bij de bespreking van de melkvoorziening van Amsterdam. Er bestaat geen enkele reden de belangen der talrijke melkgebruikers achter te stellen bij die van een gering aantal zoetboeren, die hun bestaan zoeken in het leveren van een op melk gelijkend vocht, dat voor weinige centen per liter wordt verkregen en voor goed geld wordt gesleten.

Gaat het over kleine veefokkers, die hun best doen tot het aanhouden van goed vee en die hun melkproductie voor een deel uitventen en voor een ander deel leveren aan de zuivelfabriek, dan dient te worden gewaakt tegen het sorteeren der melk. Hieronder worden verstaan alle handelingen, welke ten doel hebben de melkproductie van de stal te splitsen in een vetrijk

gedeelte, dat naar de fabriek gaat en een vetarmer, minder kostbaar gedeelte, dat voor de consumenten wordt bestemd. Ook dit sorteeren kan worden tegen gegaan door het stellen van doeltreffende eischen aan de samenstelling van consumptiemelk. Zij dienen zoo hoog te zijn, dat het sorteeren geen zin meer heeft. Hier mag worden opgemerkt, dat voor de bedrijven, welke industriemelk en consumptiemelk leveren, het stellen van hooge eischen aan de laatste ten slotte voordelig is. Het schakelt de houders van minderwaardig vee als concurrenten uit.

Niettemin blijft ook voor den kleinen veefokker, die zijn melkdieren goed verzorgt, het bezwaar bestaan van vrij aanmerkelijke schommelingen in de samenstelling van de melk uit zijn stal. En op een kwaden dag voldoet deze niet aan de hoogere eischen, waarvan in de voorgaande beschouwingen sprake is, als gevolg van omstandigheden buiten den wil van den veehouder. Deze mogelijkheid blijft bestaan, ook indien de gemiddelde samenstelling der melk in den regel wel voldoende is. De kleine melkers staan echter niet weerloos tegenover dit gebeuren. In vele gevallen zullen zij kunnen samenwerken, met elkaar of met een zuivelbedrijf. In Friesland treft men van de laatstgenoemde samenwerking wel voorbeelden aan. Ten bate van den consument, maar óók van den veehouder. Beide categorieën hebben dan voordeel van den gunstigen invloed, welke van een modern zuivelbedrijf kan uitgaan. Er zal hier en daar wel een moeilijk geval overblijven, maar het bezwaar van de kleine melkers, die niet mee kunnen komen, mag vooral niet worden overdreven. Door overdrijving zouden slechts onbekwame bedrijfsvoering en misbruiken in de hand worden gewerkt, tot voordeel van enkelen, die dit niet verdienen, en tot schade van vele verbruikers. Houdt men te veel rekening met de schommelingen in de samenstelling van de melk, welke vooral het vetgehalte betreffen en welke óók voorkomen in bedrijven met een grooter aantal koeien, dan komt men tot het stellen van te lage scheikundige eischen. En hiermee gaat onvermijdelijk samen het houden van minderwaardig melkvee, slappe bedrijfsvoering en verwaarloozing der hygiëne van het vee en van de melkwinning.

Vat men de hoofdzaken samen van hetgeen hiervoor is beoogd, dan kan het navolgende worden gezegd betreffende maatregelen door de overheid te nemen tot het op peil brengen en houden van de hoeveelheid voedingsstoffen in consumptiemelk.

Vastgesteld moet worden het percentage waaronder het vetgehalte niet mag dalen en tevens een dergelijk percentage voor de vetvrije droge stof. Het geëischte vetgehalte moet zoo dicht mogelijk liggen bij het jaargemiddelde van het vetgehalte der melk, zooals deze in Nederland wordt gewonnen. Voor gemeenten waarin voorloopig niet kan worden voldaan aan den gestelden eisch, moet tijdelijk een lagere norm kunnen worden aangenomen, met toestemming van de Kroon, overeenkomstig artikel 15, sub 3, der Warenwet. In bepaalde gebieden zouden op overeenkomstige wijze ook hoogere eischen kunnen worden gesteld. Een onderscheid voor de verschillende jaargetijden moet bij het vaststellen van het vereischte gehalte aan vet, niet worden gemaakt.

De te vorderen laagste toelaatbare gehalten voor vet en voor vetvrije droge stof moeten worden vastgesteld op grond van het onderzoek van melk, welke zonder twijfel is „zoo van de koe”. Bruikbare gegevens hieromtrent zullen vele zuivelfabrieken kunnen verschaffen, vooral ten opzichte van het vetgehalte. Het cijfermateriaal, dat door de keuringsdiensten van waren wordt verkregen bij het onderzoek van de ten verkoop geboden consumptiemelk, is voor het gestelde doel niet bruikbaar.

Leeuwarden, November 1937.

LITERATUUR:

- Codex Alimentarius, No. 1, Melk: 1907 en 3e Aangevulde Druk 1920.
- W. van Dam en L. C. Janse: Het verband tusschen vet- en caseïnegehalte van melk van afzonderlijke boerderijen en de beteekenis daarvan voor de uitbetaling door coöperatieve boter- en kaasfabrieken (Verslagen van Landbouwkundige Onderzoekingen der Rijkslandbouwproefstations, No. XXXVI—1931).
- F. Kestra: Onderzoek naar de verhouding van vet en caseïne in de mengmelk van zuivelfabrieken, 1936.
- Rapport der Melkcommissie, Stadsdrukkerij van Amsterdam, 1932.
- Handelingen van het Genootschap ter bevordering van Melkkunde, 1928, II.
- Particuliere inlichtingen.



Heeft de indeeling van de Flexnergroep der dysenteriebacteriën volgens Andrewes en Inman epidemiologische beteekenis?

DOOR

Dr. A. W. POT,
bacterioloog aan het Instituut.

De verwekkers van bacillaire dysenterie behooren, naar wel algemeen bekend zal zijn, niet alle tot ééne soort, ook al hebben zij zekere gemeenschappelijke kenmerken. Naast die, welke in bouillon een toxine vormen en waaraan de namen van *Shiga* en *Kruse* verbonden zijn, heeft men „atoxische” stammen leeren kennen, die op hun beurt tot verschillende soorten behooren. Alleen deze laatste hebben voor Nederland beteekenis; *Shiga*—*Kruse*-bacteriën werden hier niet dan bij hooge uitzondering gekweekt (o.a. door *Spronck*).

Of het geheel juist is om de dysenteriebacteriën naar de toxinevorming in te deelen, kan om twee redenen worden betwijfeld; in de eerste plaats beweren sommigen ook bij z.g. „atoxische” stammen toxinen te hebben aangetoond en in de tweede plaats kunnen infecties met „atoxische” bacteriën soms binnen 24 uur onder vergiftigingsverschijnselen doodelijk verlopen. Ook hier geldt: „verba valent usu”.

Tegen de indeeling van *Kruse* in dysenterie- en *pseudo*-dysenteriebacteriën, waarmede hij de „atoxische” stammen wil aanduiden, zijn ook bezwaren in te brengen.

Van de „atoxische” stammen is het type „Sonne”, ook wel „*Kruse*—*Sonne*” of „*Rasse-E*” genoemd, zonder twijfel in ons land het wijdst verspreid. Het beloop der infectie is vaak zoo weinig ernstig, dat in vele gevallen een bacteriologisch onderzoek der ontlasting achterwege blijft.

Naast de „Sonne”-stammen komen hier dysenteriebacteriën voor, welke tot de *Flexner*groep behooren. Op vele wijzen heeft men getracht deze groep van nauwverwante bacteriën te splitsen. Sommige van deze indeelingen hebben geen algemeene toepassing gevonden (b.v. die van *Shiga* en van *Sonne*), andere worden of werden in ruimeren kring nagevolgd, namelijk die van *Hiss* en *Russell*, door *Lentz* in het „Handbuch der pathogenen Mikroorganismen” gepropageerd, die van *Kruse*, en in de Angelsaksische landen die van *Andrewes* en *Inman*¹⁾.

Sinds het najaar van 1931 wordt in het Centraal Laboratorium, resp. Rijks Instituut voor de Volksgezondheid, het zuiver serologische schema van *Andrewes* en *Inman* gevolgd. De serologische types van de *Flexner*groep worden hierbij met de letters V tot en met Z aangeduid; daarnaast onderscheidde *Andrewes* en *Inman* de „subtypes” V—Z en W—X. De redenen, waarom de te voren gevolgde indeeling volgens *Hiss* en *Russell*, met de namen „Hiss” of „Y”, „Flexner” s.s. en „Strong”, vervangen werd door de nieuwere Engelsche, waren van technisch-bacteriologische aard en behoeven dus hier niet te worden besproken.

Andrewes en *Inman* zelf waren zich bewust, dat hun werk niet volmaakt was; van de 116 „Flexner”-stammen, welke zij onderzochten, bleven 8 ongeclassificeerd.

Nu en dan worden dan ook bij lijders aan bacillaire dysenterie stammen gevonden, die men door een eenvoudige agglutinatieproef met de 5 typische sera niet bij één der types kan onderbrengen, hoewel zij overigens de eigenschappen van „Flexner”-bacteriën hebben en wel kan het gebeuren, dat de stam „inagglutinabel” is of omgekeerd, dat hij door alle of bijna alle sera tot in ongeveer dezelfde verdunning wordt samengeklonterd.

In het eerste geval blijft men, als men althans den voorzichtigen eisch stelt, dat het cultureele en het serologische onderzoek der gevonden stammen met elkander in overeenstemming moeten zijn, in twijfel of men met een „Flexner”-stam te maken heeft, in het tweede geval kan wel worden aangetoond, dat de stam tot de groep behoort, maar *niet* tot welk type binnen de groep.

In de volgende bladzijden zal getracht worden een antwoord

¹⁾ Med. Res. Committee. Spec. rep. series. no. 42, 1919.

te geven op de vraag, of de typenindeeling van *Andrewes* en *Inman* slechts de liefhebberij van sommige bacteriologen is, die steeds weer trachten hunne vondsten in een grooter aantal hokjes onder te brengen, dan wel of zij ook beteekenis heeft voor de *epidemiologie* der bacillaire dysenterie.

Het materiaal, dat *Andrewes* en *Inman* onderzochten, was in dit opzicht ongeschikt; het bestond uit stammen van laboratoriumverzamelingen en uit die, welke Britsche bacteriologen in militairen dienst hun van verschillende oorlogsterreinen toezonden.

Om epidemiologische besluiten te kunnen trekken uit een bacteriologische typebepaling dient men zeker te zijn, dat de tot grondslag voor de indeeling gekozen eigenschap(pen) niet verandert(en) tijdens de infectie en evenmin bij den middellijken of onmiddellijken overgang van mensch op mensch, resp. dier op mensch. Nu is vrijwel niet één eigenschap der bacteriën *volkomen* onveranderlijk; de boven geformuleerde eisch moet daarom in dien zin verzacht worden, dat veranderingen op zijn hoogst of zóó zeldzaam zijn, dat men er in de praktijk geen rekening mee behoeft te houden, dan wel zóó gering, dat zij het oorspronkelijk type herkenbaar laten.

Wat is er bekend omtrent de veranderlijkheid in den antigenen bouw van de „V” tot „Z”-types? Een overgang van het eene type in het andere is onder de omstandigheden van het laboratorium nooit waargenomen, hoewel men er doelbewust naar gestreefd heeft (*Gardner* en *Ainley Walker*²⁾). Wel gelukte het door kweken in homolog antiserum den antigenen bouw zóó te vervormen, dat de onderzochte stam in géén der typische sera meer agglutineerde. Ook heeft *Gardner* waargenomen, dat de agglutinabiliteit van een ouden laboratoriumstam, die aanvankelijk alléén in „X”-serum samenklonterde, zóó toenam, óók in heterologe sera, dat hij niet meer bij een der bekende types kon worden ondergebracht. Of deze stam „rough” geworden was, vermeldde *Gardner* niet.

Kort geleden deelde *Takita*³⁾ mede, dat hij bij Flexner-stammen twee fasen, een groeps- en een specifieke phase, ontdekte, een verschijnsel dus zooals bij de *Salmonellae* al in 1922

²⁾ A system of bacteriology IV, 1929 p. 225 e.v.

³⁾ Journ. of Hyg. 37, 1937, p. 271.

door *Andrewes* beschreven was. Bevestiging van andere zijden ware hier gewenscht; aan de epidemiologische beteekenis van de indeeling van *Andrewes* en *Inman* zouden deze fasen echter geen afbreuk doen, omdat ook in de groepsphase de stam het sterkst zou blijven agglutineeren in het homologe serum.

Terloops maakte *Takita* de opmerking, dat hij een stam, die als type „Y” geboekt stond, voor een gedegenereerden „W”-stam houdt. De gronden, waarop deze meening berust, worden ons echter onthouden.

Hoewel uit het bovenstaande wel een zekere veranderlijkheid in antigenen bouw van de Flexner-stammen blijkt, is daarmee nog geen antwoord gegeven op de vraag naar de practische beteekenis van *Andrewes'* en *Inman's* schema.

Gedurende de meer dan vijf jaar, dat in het R.I.V. het serologische type bepaald wordt, werden nu en dan Flexner-bacteriën gekweekt uit de ontlasting van dysenterielijders, bij wie gegronde reden bestond om aan te nemen, dat zij elkander besmet hadden, of wel dat zij hunne infectie aan eenzelfde bron opdeden.

Wanneer hier van „gegronde reden” wordt gesproken, bedenke men, dat men boven een zekere mate van waarschijnlijkheid niet uitkomt, die de een hooger zal schatten dan de ander. Des te grooter wordt die waarschijnlijkheid naarmate het contact tusschen de lijders nauwer was en de kring, waartoe zij behooren, meer besloten is. Soms gelukte het ook om meer dan eens bij denzelfden lijder Flexnerbacteriën te kweken. Deze waarnemingen kunnen bijdragen tot de beantwoording van de vraag in hoeverre de antigene bouw standvastig blijft gedurende het beloop der infectie.

a. In 1933 werden bij een militair in een tijdsbestek van ruim drie weken vijfmaal Flexnerbacteriën gevonden.

Vier dagen na het agglutineeren van een bouillonkweek van dezen stam, kreeg één der leden van het laboratoriumpersoneel een kortdurende, maar onmiskenbare, dysenterie, waarbij tweemaal Flexnerbacteriën werden gekweekt.

Al deze zeven kweken behoorden tot het type „W”.

b. In 1935 kwam in een psychiatrische inrichting een dysenterieepidemie voor.

Uit de ontlasting van 6 verpleegden werden Flexnerbacteriën gekweekt, welke alle tot het type „W” behoorden.

De ontlasting van één lijder herbergde een bacteriestam, die weliswaar de cultureele en biochemische eigenschappen van bact. dysenteriae-Flexner bezat, maar in géén der vijf typische sera agglutineerde. In 1936 kwamen in dezelfde inrichting weer enkele Flexnerinfecties voor, wederom door het „W”-type veroorzaakt.

c. Bij een 3½-jarigen jongen werden in December 1936 Flexnerbacteriën gevonden van het type „Z”. Enkele dagen later bleek de ontlasting van een meisje van 16 maanden, dat aan buikloop leed en tot een verwant gezin behoorde, eveneens Flexner „Z”-bacteriën te bevatten. De behandelende arts deelde op het formulier, dat deze inzending begeleidde, spontaan mede, dat de beide patiëntjes contact met elkander gehad hadden. Weer een paar dagen later werden „Z”-bacteriën gekweekt uit de faeces van den vader van het eerstgenoemde kind.

d. Het voorkomen van een aantal dysenteriegevallen in een psychiatrische inrichting leidde tot een uitgebreid bacteriologisch onderzoek van de ontlasting van verpleegden en verplegend personeel.

Uit de vele honderden monsters ontlasting, die tusschen het begin van Januari en het einde van Juni 1937 ter onderzoek kwamen, werden twee en dertigmaal Flexnerbacteriën gekweekt.

Bij één der verpleegden werden viermaal dysenteriebacteriën gevonden, bij zes anderen tweemaal.

Het serologisch onderzoek van al deze kweeken leidde tot dezelfde uitkomst, nl. type-„Z”.

Driemaal werd een twijfelachtige uitslag genoteerd en wel (1) werd bij een verpleegde, wier ontlasting al eerder Flexner-„Z”-bacteriën bevatte, een stam gevonden, die op een Flexnerstam geleek, maar in alle Flexnersera, zelfs in Sonne-serum agglutineerde, (2) werden eens bacteriën gekweekt, die aan het type „Sonne” deden denken, maar niet in „Sonne”-serum agglutineerden, en (3) werd bij een lid van het personeel een stam gevonden, die op de „bonte rij” de eigenschappen van dysenterie-Flexner toonde, maar inagglutinelabel was en dit ook na overenten bleef.

Tenslotte zij vermeld, dat bij één patiënte, wier ontlasting

in Januari 1937 een positieve uitkomst leverde, ook reeds in Juni 1936 Flexner-„Z”-bacteriën gevonden waren.

e. Een gezin van vijf personen kwam in den zomer van 1936 met verlof uit Indië en nam voorloopig zijn intrek bij een broer van den man. Vele reizigers op de boot hadden buikklachten. Eenige dagen na aankomst werden de verlofgangers ziek met heftigen buikloop. Uit de ontlasting van één der kinderen werden Flexnerbacteriën, type-„Z”, gekweekt. Tien dagen later leverde de faeces van den, inmiddels ook ziek geworden, gastvrijen oom Flexnerbacteriën type-„V”.

Uit het voorafgaande blijkt, dat de ervaring in het R.I.V. beperkt is tot de types „W” en „Z”. Als uitzondering werden wel eens andere types gevonden; deze betroffen altijd sporadisch voorgekomen gevallen.

Laten wij de laatste waarneming (e), die nadere bespreking vraagt, buiten beschouwing, dan blijkt, dat bij een samenhangende reeks Flexnerinfecties als regel hetzelfde serologische type gevonden wordt en dat overgangen van het eene type in het andere evenmin werden aangetroffen bij denzelfden lijder tijdens het beloop zijner ziekte.

Er zijn aanwijzingen, dat een stam ook onder natuurlijke omstandigheden, evenals *Gardner* en *Ainley Walker* dit door kweken in homoloog serum bewerkten, „inagglutinabel” kan worden.

Het sub e medegedeelde is voor méér dan één uitlegging vatbaar. Het blijft mogelijk, dat de dysenterie van den oom niets te maken had met die van zijn Indische familieleden. Ook al omdat Flexnerinfecties in de gemeente, waar deze huis-epidemie voorkwam, uiterst zeldzaam zijn, is deze veronderstelling wel zéér onwaarschijnlijk. Onbewezen is ook, dat alle verlofgangers het type „Z” herbergden. Slechts bij één werden zij gevonden. Waren er wellicht onder, die aan een „V”-infectie leden of kwamen „V” en „Z”-bacteriën bij denzelfden lijder naast elkander voor? Hoewel dit open vragen blijven, ligt een overgang van het „Z”- in het „V”-type m.i. het meest voor de hand. In het voorafgaande werd medegedeeld, dat *Andrewes* en *Inman* stammen vonden, die zij tot het subtype „V-Z” rekenden, een tusschenvorm derhalve tusschen de types „V” en „Z”. Is de veronderstelling van een

overgang tusschen beide types juist, dan zou het subtype „V-Z” niet slechts een *tusschenvorm*, maar ook een *overgangsvorm* kunnen zijn.

Samenvatting.

Mededeeling van eenige waarnemingen, welke kunnen bijdragen tot de beantwoording van de vraag, of de indeeling van de Flexnergroep volgens *Andrewes* en *Inman* beteekenis heeft voor de epidemiologie der bacillaire dysenterie.

Over enkele enzoötiëen veroorzaakt door *S. typhi-murium*¹⁾

DOOR

Dr. JAC. JANSEN.

Niet alleen het bepalen van de antigeenstructuur van een *Salmonella*, ook het vaststellen van de cultureele eigenschappen is van zeer groot belang. Dit moge o.a. gebleken zijn uit mijne publicaties in dit tijdschrift (1) (2) over de eendensalmonellose en hare beteekenis voor den mensch.

Van hoeveel belang de bepaling van het cultuurtype van een *Salmonella* in het algemeen is, werd door mij uitvoerig besproken in een artikel over de classificatie der typhus-paratyphus-groep (3), welk artikel met het zoo juist genoemde (1), verwijst naar een omvangrijke literatuur, deze problemen betreffende.

Het hieronder volgende heeft tot doel aan te toonen de groote belangrijkheid van het bepalen van het cultuurtype in het bijzonder van *S. typhi-murium*.

Bij een vogelliefhebber, die in zijn tuin zeven naast elkaar gelegen voliëres met allerlei vogels heeft, stierf 20 Maart 1937 een pestvogel (*Bombycilla garrulus*).

Bij het kleine cadaver konden macroscopisch geen afwijkingen waargenomen worden. Het bacteriologisch onderzoek had tot resultaat dat uit hart, lever en nier een reincultuur van bacteriën verkregen werd. Het gekweekte microörganisme bleek na determinatie te behooren tot het genus *Salmonella*. (In 1934 stelde een internationaal comité een rapport samen waarin de naam „genus *Salmonella* Lignières” voor de typhus-paratyphus-groep werd aangenomen en werd een definitie gegeven welke de

¹⁾ Ingezonden: November 1937.

eigenschappen bepaalde welke een bacil moet hebben om tot het genus *Salmonella* gerekend te kunnen worden). Ook uit den darminhoud van dezen pestvogel werd een *Salmonella* gekweekt.

22 Maart 1937 stierven nog 2 pestvogels, uit beiden werd eveneens een *Salmonella* geïsoleerd. De 3 pestvogels waren eenige dagen te voren aangekocht bij een vogelhandelaar in de provincie Utrecht.

Daar de vogelliefhebber er prijs op stelde toch pestvogels in zijn volière te houden, werden, ruim 1 maand later, opnieuw twee stuks aangekocht, thans uit voorzorg bij een andere vogelhandelaar in de provincie Groningen. Deze vogels waren bij aankomst reeds ziek en stierven spoedig. De diagnose was wederom Salmonellose. De 5 gekweekte *Salmonella*'s bleken allen op grond van een agglutinatorisch onderzoek te zijn: *S. typhi-murium*. Voor dit onderzoek werd gebruikt serum van een konijn, dat destijds voorbehandeld was geworden met een bekende *S. typhi-murium* stam (antigeenstructuur: IV. V. XIII. i.1.2.3). Een bekende rhamnose positieve *S. typhi-murium*-stam (kat), een bekende rhamnose negatieve *S. typhi-murium*-stam (eend VI) en de pestvogelstammen werden d.m.v. het *S. typhi-murium*-serum van het konijn onderzocht.

De resultaten der agglutinaties na 2 uur waren;

serumverduunning:	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000
Pestvogel U I. .	+	+	+	+	—	—
Pestvogel U II. .	+	+	+	—	—	—
Pestvogel U III. .	+	+	+	—	—	—
Pestvogel G I. . .	+	+	+	—	—	—
Pestvogel G II. . .	+	+	+	—	—	—
Eend VI.	+	+	+	—	—	—
Kat	+	+	+	—	—	—

Voor alle zekerheid werd nog een verzaadigingsproef verricht; hetzelfde *S. typhi-murium*-serum van het konijn werd verzaadigd met levende cultuur van Pestvogel U I, met dit verzaadigde serum werd toen nagegaan of het nog in staat was de stammen Kat, Eend VI en pestvogel U I te agglutineeren. Dit bleek (verduin-

ningen: 1 : 20) niet het geval te zijn. Pestvogel stam U I heeft dus alle agglutininen: IV.V.XIII.i.1.2.3. uit het serum gebonden en moet dus alle antigenen IV.V.XIII.i.1.2.3. bezitten. Er bestaan verschillende *S. typhi-murium*-typen die *cultureel* verschillen. *Hohn* en *Herrmann* hebben vooral hun aandacht gewijd aan de cultureele eigenschappen der *Salmonella*'s. Ze gebruiken 5 „arme” vaste voedingsbodems, deze bevatten als eenigste N bron $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$ en 4 „rijke” vloeibare voedingsbodems die veel N bevatten, ze zijn n.l. bereid met stierentestikelbouillon, die zeer rijk is aan eiwitten en aminozuren. In de eerste 5 wordt alleen zuur- of basevorming, in de laatste 4 zuur- en gasvorming nagegaan. Het is gebleken dat er minstens 4 *S. typhi-murium*-typen zijn.

Deze typen geven, kleine stamverschillen buiten beschouwing latende, de volgende reacties:

	Simmonssubstraat					Hottingerbouillon			
	dextrose	arabinose	rhamnose	dulcitol	Nacitraat	dextrose	arabinose	rhamnose	dulcitol
Voltype . . .	+	+	+	+	+	++	++	++	++
duiventype . .	—	—	—	—	—	++	++	++	++
eendentype . .	+	+	—	z	+	++	++	— —	++
caviatype . .	+	+	—	+	+	++	++	— —	++

(z = zwak)

De 5 pestvogelstammen werden onderzocht volgens dit systeem, het resultaat was dat allen tot het voltype bleken te behoren. Zoowel de 3 Utrechtsche als de 2 Groningsche pestvogels waren dus van hetzelfde cultuurtype; in overeenstemming hiermede is de herkomst der vogels; bij navraag bleek n.l. dat alle pestvogels ontvangen waren uit Tsjecho-Slowakije.

Teneinde verdere smetstofverspreiding te voorkomen werd de volière waarin de 3 Utrechtsche pestvogels vertoefd hadden, ontsmet. (De Groningsche vogels had de eigenaar zeer wijselijk in een kooitje in quarantaine gehouden). De ontsmetting werd op rigoureuze wijze verricht. Alle vogels in deze volière werden gedood, de beplanting werd verwijderd, de bovenste laag aarde

(ongeveer $\frac{1}{2}$ M.) werd afgegraven. Hierna werd de volière met desinfectantia tot in alle hoeken en gaten behandeld, waarna nieuwe aarde werd ingebracht waarop beplanting met andere heesters en kruiden volgde.

Deze ontsmette volière werd opnieuw met allerlei vogeltjes bevolkt. In den beginne ging alles naar wensch, totdat in September 1937 een niet lang geleden aangekochte zilvermeeuw (*Larus argentatus*) stierf. Deze meeuw bleek lijdende geweest te zijn aan enteritis; in den darm werden veel parasieten (echinostomen) gevonden. Het bacteriologisch onderzoek had tot resultaat dat een *Salmonella* gekweekt werd.

Den 4den October stierven een spreeuw (*Sturnus vulgaris*) en een draaihals (*Jynx torquilla*). Bij de spreeuw was tijdens het leven diarrhee waargenomen, bij sectie maakte de darm een te rooden indruk. Uit hart, lever, milt, nier en faeces werd een *Salmonella* gekweekt. Ook de draaihals had een te roode darm, uit de milt werd een *Salmonella* in reïncultuur gekweekt.

Het was nu van belang na te gaan of deze tweede *Salmonella*enzoötie het gevolg geweest was van de eerste, dan wel van een nieuw ingesleepte infectiebron: de meeuw. *Salmonellose* bij een meeuw werd voor het eerst vermeld door v. Dorssen, het betrof een kleine zeemeeuw (*Larus canus*). Mij bleek dat deze stam tot het rhamnose negatieve type behoorde. Op grond van deze waarneming en het feit dat meeuwen in groote vluchten azen op de eendenfarms waar het rhamnose negatieve type voorkomt, werd ook nu bij de zilvermeeuw het rhamnose negatieve type vermoed. Dit vermoeden bleek juist te zijn; ook de stammen van de spreeuw en de draaihals waren rhamnose negatief.

Uit deze gegevens blijkt dus dat de 1ste en de 2de enzoötie bij den vogelliefhebber onderling niets met elkaar uitstaande hebben. Voor den eigenaar beteekende dit dat hij zijn vertrouwen in de methode van ontsmetting na de eerste ziekte uitbraak kon behouden.

Of deze meeuw inderdaad door eenden geïnfecteerd werd, is niet met volledige zekerheid aan te toonen evenmin als dit aan te toonen is van de rat (*Mus norvegicus*) die in een dieren-tuin dood gevonden was en waaruit v. Dorssen een *Salmonella* isoleerde waarvan ik het rhamnose negatieve karakter kon aantoonen; dit dier was gevonden nabij de eendenvijver. Gezien

echter het feit dat bij onze eenden het rhamnose negatieve type lang niet zeldzaam is en inderdaad duizenden meeuwen de besmette farms bezoeken is de mogelijkheid zeker groot.

De *S. typhi-murium* infectie bij de eend mag bekend verondersteld worden. Er zij hier slechts herinnerd aan het feit dat het ovarium meestal geïnfecteerd wordt, waardoor besmette eieren gelegd kunnen worden zoodat de mensch door het eten van deze eieren ziek kan worden.

Het belangrijke nu is, dat vindt men bij den mensch het rhamnose negatieve type, dan is dat een zeer sterke aanwijzing voor het verdenken van de eend als infectiebron.

Reeds eerder werd door mij in de literatuur hierop gewezen. *Hohn* en *Hermann* zeggen, na mijne meening hierover aangehaald te hebben: „Die Richtigkeit dieser Auffassung wird nun durch unsere Beobachtungen am Menschen gestützt” waarna ze 9 frappante voorbeelden geven. Hun aardigste voorbeeld is het geval van rhamnose negatieve *S. typhi-murium* bij een zuigeling wier moeder een dooier van een eendenei aan de melk in de zuigflesch had toegevoegd.

In ons land is de *Salmonella* endemie bij den mensch na de kermis te W. door het eten van consumptie-ijs hoogstwaarschijnlijk een dergelijk geval geweest. *De Koning* dacht hier aan de eend als infectiebron, hem bleek dat inderdaad eendeneieren bij de ijsbereiding gebruikt waren; de eenden werden door hem onderzocht en zoowel agglutinatorisch door bloedonderzoek van het levende dier als door cultiveeren uit ei en eend werd *Salmonellose* geconstateerd. De gekweekte bacil werd door mij gedetermineerd als rhamnose negatieve *S. typhi-murium*.

Een overeenkomstig voorbeeld is een geval van *Salmonellose* bij apen.

In een dierenpark stierven eenige apen (*Macacus rhesus*) aan enteritis; de 1ste aap (21 September 1937) bleek geleden te hebben aan acute haemorrhagische enteritis. De uit hart, lever, milt, nieren en faeces in reincultuur gekweekte bacil bleek *Salmonella* te zijn.

De 2de aap (4 October 1937) was blijkbaar minder acuut ziek geweest; coecum, colon en rectum waren diphteritisch ontstoken; alleen in de faeces werd *Salmonella* aangetoond. Beide stammen bleken na agglutinatorisch onderzoek *S. typhi-murium* te zijn. De stammen werden n.l. door bekend *S. typhi-murium*-

serum tot den eindtiter geagglutineerd (bekende kattenstam na 2 uur 1 : 8000+; aap I, 1 : 8000; en aap II 1 : 16000). Bovendien bleek het *S. typhi-murium*-serum volledig agglutinenen vrij geworden te zijn na verzadiging met stam aap I. Het verzadigde serum was niet meer in staat om in verdunning van 1 : 20 af agglutinaties te geven met de stam van de kat. Onderzoek naar het cultuurtype bracht aan het licht, dat beide stammen rhamnose negatief waren. Bij navraag bleek dat de apen geregeld rauwe eendeneieren kregen van de in het park levende eenden. Getracht zal worden, de bezwaren in het dierenpark zijn n.l. zeer groot, de *Salmonella*-infectie bij de eenden aan te toonen.

De zoo juist genoemde vogelliefhebber heeft wederom zeer streng doorgevoerde ontsmettingsmaatregelen genomen en in het dierenpark zijn de apen die met de besmetting in aanraking geweest kunnen zijn met vaccin geënt. Tot heden hebben zich bij geen van beiden nieuwe gevallen voorgedaan.

S. typhi-murium enzoötieën bij duiven komen in ons land vrij veel voor. Alle tot nu toe in het Instituut voor Parasitaire- en Infectieziekten geïsoleerde stammen bleken te behoren tot het ammoniumzwakke type. Hierbij moet vermeld worden dat hier wel tevens een afwijking in de antigeenstructuur wordt gevonden: factor V ontbreekt. Van belang is dat ook duiven-eieren bij den mensch *Salmonellose* kunnen veroorzaken. *Clarenburg* en *Pot* vermeldden een geval van voedselvergiftiging door pudding bereid met duiven-eieren, *Hohn* en *Hermann* toonden van dezen stam de typische kenmerken aan n.l. geen factor V en ammonium zwak. Zou men dus in de toekomst bij den mensch of bij andere diersoorten een ammoniumzwakke *S. typhi-murium* vinden dan is er aanleiding om aan de duif als infectiebron te denken; evenzoo verdenke men de eend als oorzaak, als een rhamnose negatief type gediagnostiseerd wordt. Vindt men het voltype dan tast men, als andere gegevens ontbreken, in het duister, want dit type komt veelvuldig en verspreid over het dierenrijk (mensch, zoogdieren en vogels) voor.

Hohn en *Hermann* vermelden nog een vierde type, gevonden bij de cavia. Dit type is evenals van de eend rhamnose negatief, doch terwijl het eendentype in den Simmonsbodem gering de dulcitol omzet, vergist het caviatype de dulcitol optimaal snel. Werden de eerste 3 typen in ons land door mij aangetoond, dit 4de type nog niet; wel werd onlangs een *S. typhi-murium*-

enzoötie bij caviae vastgesteld, doch deze stam bleek tot het voltype te behooren.

Uit de mededeelingen over de twee *Salmonella* gevallen in de volière blijkt reeds, dat men besmette milieus zal kunnen aantreffen waar meer dan 1 type geïsoleerd wordt. Het was dan ook niet bevreemdend dat ik bij een aantal door *Bos* geïsoleerde stammen van een enzoötie in de zangvogelvoorraad van een handelaar de drie typen: voltype, rhamnose negatieve type en het ammoniumzwakke type, kon vaststellen. Bij een vogelhandelaar zijn de besmettingsbronnen duif en eend (waarbij ook het voltype voorkomt) meestal aanwezig en bovendien wordt dikwijls eidooier aan zangvogels gevoerd.

Uit het voorgaande moge gebleke zijn, en dat is het belangrijke punt, de groote beteekenis van het cultuurtype. *Daar waar de antigeenstructuur in den steek laat*, immers het voltype en het rhamnose negatieve type hebben voor zoover met de tegenwoordige techniek valt na te gaan dezelfde formule, *geeft het cultuurtype verschilpunten die belangrijke aanwijzingen kunnen geven over den infectiebron*.

Het gaat niet aan de vraag te stellen of de antigeenstructuur — dan wel de cultuurtype-bepaling het voornaamste is. Beide zijn onmisbaar. Men krijgt echter wel den indruk dat het cultuurtype juister den aard van den bacil aanduidt dan de antigeen-

	Simmonssubstraat					Hottingerbouillon			
	dextrose	arabinose	rhamnose	dulcitol	Nacitraat	dextrose	arabinose	rhamnose	dulcitol
<i>S. typhi-murium</i> var. <i>copenhagen</i>									
1147	—	—	—	—	—	++	++	++	++
6920	+	+	+	z	z	++	++	++	++
659	+	+	+	+	+	++	++	++	++
3146	+	+	—	z	+	++	++	—	++

structuur. Immers een van mijn eendenstammen die de V mist, heeft toch de typische eigenschap rhamnose negatief. Een *S. typhi-murium* stam van de muis (56') door v. *Dorssen* geïso-

leerd, miste de V, doch was volledig voltype gebleven. Alleen bij de duif zien we constant bij het ammoniumzwakke type de V ontbreken en is een aparte naam te verdedigen (*Edwards* noemt zijn duivenstammen, allen zonder V, *S. typhi-murium* var. *storr's*). *Kauffmann* heeft echter alle *S. typhi-murium* stammen zonder V factor *S. typhi-murium* var. *copenhagen* genoemd, maar het groote bezwaar hiertegen is, dat nu uiteenlopende typen onder één naam kunnen worden samengevat.

Kauffmann was zoo welwillend mij vier van zijn stammen, afkomstig van den mensch te zenden en inderdaad werden hierbij het voltype, het rhamnose negatieve type en het ammoniumzwakke type aangetoond. (Zie tabel)

De belangrijkheid van het cultuur-type moge uit al deze voorbeelden duidelijk gebleken zijn.

Zusammenfassung.

Verf. weist aus das Vorkommen von Endemien und Enzootien, die durch *S. typhi-murium* von verschiedenem Kulturtyp verursacht werden. Der Kulturtyp gibt wichtige Hinweise für das Feststellen der Infektionsquelle. Dies ist besonders wichtig bei Nahrungsmittelvergiftungen des Menschen und für die Beziehungen zwischen die Tiersalmonellosen untereinander. Der Rhamnosenegative Typ, der bisher beim Menschen und bei der Ente (*Anas Boschas*) bekannt war, wurde weiter gefunden bei Ratte (*Mus norvegicus*), Sturmmöwe (*Larus canus*), Silbermöwe (*Larus argentatus*), Star (*Sturnus vulgaris*), Wendehals (*Jynx torquilla*), Kanarienvogel (*Serinus canarius* L.) und Affe (*Macacus rhesus*).

LITERATUUR.

1. Eendensalmonellose en hare beteekenis voor den mensch. *Antonie van Leeuwenhoek. Tijdschrift v. Hygiëne, microbiologie en serologie.* 3, 184 (1936).
2. *Salmonella* als oorzaak van voedselvergiftiging (consumptie ijs) bij den mensch. *Antonie v. Leeuwenhoek.* 3, 241 (1936).
3. Ueber die Klassifikation der Typhus-Paratyphus-Gruppe. *Zeitschrift für Inf. Krankh.* 52, 11 (1937).



Een poging tot het cultiveeren van lepra-bacillen

DOOR

Dr. SARDJITO en Dr. A. MOCHTAR.

Slot.

TWEEDE HOOFDSTUK.

1. Onderzoek van de antigene eigenschappen der geïsoleerde zuurvaste bacillen.

Om nader te komen tot de vraag of wij hier te doen hebben met een leprabacillencultuur, hebben wij deze verder onderzocht op haar antigene eigenschappen.

a. De agglutinatie.

Deze reactie is met de bacillen van Sidik uit het bilabsces niet wel doenlijk. Al is de gelijkmatige suspensie van de micro-organismen gemakkelijk te verkrijgen, zij vertoonde daarentegen met contrôle sera van niet leprozen reeds positieve agglutinatie, die wat de hoogte van den titer en de qualiteit der agglutinatie betreft, niet te scheiden zijn van die, verricht met sera van leprozen.

Na verschllende voorproeven verricht te hebben zoowel met culturen uit Lubenau als met die van glycerine bouillon, werden de agglutinaties niet verder voortgezet.

b. Allergische reactie.

Als antigeen voor deze reactie werd gebruikt een glycerine bouillon cultuur van de bacillen Sidik uit bilabsces van 2 maanden oud, die gedood werd door ze te verhitten op 100°

gedurende 10 minuten, daarna steriel gefiltreerd door dubbel filtreerpapier. Het heldere filtraat, dat gebruikt werd voor antigeen, werd geconserveerd met carbol tot een oplossing van $\frac{1}{2}$ %. Dit atigeen heeft wel veel van bouillon filtré Denys.

Als vergelijking werd ook de Mitsuda reactie verricht. Het antigeen werd bereid van een leproom, dat fijngeknipt, gewreven werd en gesuspenderd in zoutsolutie en wel in 20 voudig gewicht van het leproom. Deze suspensie werd door dubbelgevouwen gaas gefiltreerd en het filtraat gesteriliseerd op 100° gedurende 15 min. Deze vloeistof werd als antigeen gebruikt. Bij de voorproef, waarbij een paar personen intracutaan met $\frac{1}{20}$ cc van het bouillon filtraat aan den binnenkant van den onderarm ingespoten werden, zagen wij als reactie slechts een kleine zwelling en roodheid zooals men pleegt te zien bij de reactie van Mantoux.

Daarom werd de voorproef uitgebreid bij 20 leprozen van de C.B.Z. Semarang. Ook hier zagen wij, dat de reactie zonder heftige verschijnselen goed verdragen werd.

Ten slotte werd de werkelijke proef verricht bij de patiënten van de leprozerie van Pelantoengan met medewerking van de doktoren Mej. E. A. van Teutum en J. B. Sitanala. Behalve leprozen werden ook nog 32 gezonde personen, bedienden van de leprozerie, uit de aard personen, die veel contact met leprozen hebben, in de proef betrokken.

Verder werd ook 1 framboesia patiënt, niet lepreus, met de beide antigenen geënt.

Op den rechterarm werd intracutaan ingespoten met het antigeen volgens Mitsuda bereid en op den linkerarm werd met het bouillon antigeen geënt.

De reactie werd afgelezen op den volgenden dag, een week en twee weken daarop.

Negatief is het als er geen ontstekingsverschijnselen zijn gedurende de observatietijd van 2 weken. Als positief werd de reactie beschouwd, indien infiltraat en roodheid waar te nemen is, al worden deze verschijnselen pas 2 weken na de injectie geconstateerd.

Het resultaat is in de volgende tabel gerangschikt.

Allergische reactie verricht d.d. 20 Juni 1933.

	Bouillon antigeen Sidik			Mitsuda antigeen			Totaal
	+	±	—	+	±	—	
C ₁	1	—	—	1	—	—	1
C ₂	6	—	1	3	1	3	7
C ₂	18	4	1	10	4	9	23
N ₁	1	—	—	1	—	—	1
N ₂	4	—	1	3	2	—	5
N ₃	27	8	—	25	9	1	35
C ₁ N ₁	2	—	—	1	1	—	2
C ₂ N ₁	—	1	—	1	—	—	1
C ₂ N ₂	5	—	—	1	2	2	5
C ₂ N ₃	1	—	—	—	1	—	1
C ₃ N ₁	1	—	—	—	1	—	1
C ₃ N ₂	4	—	—	2	—	2	4
C ₃ N ₃	6	1	—	4	2	1	7
	76	14	3	52	23	18	93
Gezonde personen	32			32			32
leproserie bedienden							
Framboesia patiënt	1			1			1

Onder de leprozen bij wie de allergische reactie verricht werd, vertoonden 7 patiënten sterke verschijnselen ten gevolge van de inspuiting met het bouillonfiltraat.

1. Heer L. C₃: Aan den linkeronderarm een rood pijnlijk infiltraat van 10 c.M. lang en breed als de mediane zijde van den onderarm.
2. Heer K. C₃: Zooals Heer L., daarbij nog gezwollen okselklieren.
3. Mevr. E. C₃: Als Heer L., daarbij nog koorts
4. Heer C. C₃: Als Mevr. E., ook met koorts.
5. Mej. K. C₃: Als Heer L., daarbij kan zij den arm moeilijk strekken.
6. L. H. Y. C₃: Als Heer L., daarbij nog hooge koorts met uitbreken van nieuwe lepromen op het hoofd, rug, rechter schouder en beenen, de klier van den linkeroksel pijnlijk gezwollen.
7. S. H. Y. C₃: als L. H. Y.

Uit het resultaat van de allergische proeven is te concluderen, dat het bouillon filtraat van de cultuur Sidik sterkere reactie geeft dan het Mitsuda antigeen. Slechts bij 3 van 93 leprozen was de reactie met het eerste antigeen negatief.

De uitslag van de Mitsuda reactie is ook niet precies zooals Mitsuda beschreven heeft. Deze onderzoeker komt tot een resultaat, dat de reactie positief is bij de N gevallen en negatief bij de C gevallen. Hayashi herhaalde de proeven van Mitsuda en kreeg bij de 64 N gevallen 62 positieve en bij 125 C gevallen 11 positieve reacties. Het resultaat van Mitsuda wordt verder bevestigd door Esseveld. Daarbij merkt deze laatste onderzoeker nog op dat een groot percentage van contrôle personen positief reageeren op de allergische reactie.

Wij hebben daarentegen:

bij 31 C	gevallen 14	positief,	5	twijfelachtig	en	12	negatief
„ 41 N	„ 29	„ 11	„ „	1	„		
„ 21 CN	„ 9	„ 7	„ „	5	„		

Toch merkt men, als men de cijfers aandachtig bekijkt, wel op, dat de reactie bij de N gevallen meer positieven aanwijst, dan bij de CN en de C gevallen, verhoudingsgewijs gesproken. Dit beteekent dat wij de proeven van Mitsuda en die van Hayashi slechts gedeeltelijk kunnen bevestigen. Daar wij de proeven verricht hebben hoofdzakelijk bij patiënten van het Maleische ras (53) en voor een klein deel bij het Chineesche (16) en bij het Europeesche ras (24), is het denkbaar dat het quantitatief verschil der resultaten toe te schrijven is aan den invloed van het ras, bij wie de reactie verricht werd; immers Mitsuda en Hayashi deden hun proeven bij Japansche leprozen.

C. Complementbindingsproeven met konijnen antisera.

Met deze reactie trachten wij aan te toonen of de stam Sidik uit het bilabsces, dezelfde antigene eigenschappen heeft als leprabacillen. Bij het vergelijken hiervan dienen ter contrôle parallele onderzoekingen verricht te worden met andere zuur-vaste bacillen. Op deze wijze hebben wij bij onze proeven de volgende bacillen gebruikt:

- 1e. leprabacillen uit lepromen verzameld
- 2e. stam Sidik uit het bilabsces
- 3e. stam t. b. c. 47

4e. stam t. b. c. 1773

5e. stam t. b. c. rund, afkomstig van den Dir. Veeartsenijkundig Instituut Prof. Dr. F. L. Huber

6e. stam t. b. c. kip

7e. stam Tentu chromogeen uit leproom geïsoleerd

8e. stam timotheebacillen (chromogeen) afkomstig van Prof. Dr. J. E. Dinger

en later nog andere stammen.

De eerste stap die bij deze proeven gedaan wordt, is het zoeken naar een voor een bepaald doel geschikt antigeen.

Eitner, die als eerste deze reactie bij de lepra verrichtte, gebruikte gewoon zoutsolutie extract van een huid leproom.

In navolging van den eersten onderzoeker hebben wij in den beginne waterig antigeen van den stam Sidik bereid. De bacillen worden geëxtraheerd in aqua dest; bij het waterig extract wordt later NaCl en carbol toegevoegd tot er een zoutconcentratie ontstaat van 0,9 % en $\frac{1}{2}$ % carbol.

Dit waterig antigeen wordt eerst geprobeerd met sera van leprozen en met contrôle sera, om te zien hoe de reactie verloopt. Bij herhaalde voorproeven hebben wij opgemerkt, dat het antigeen een wisselvalligen uitslag gaf. Ook wanneer wij de bacillen eerst dooden door verwarming $\frac{1}{2}$ uur bij 60° of 100° konden wij geen goed antigeen krijgen; het bindt na verwarming juist geen complement meer. Op grond hiervan wordt naar een andere methode van extract-bereiding gezocht.

In de literatuur wordt melding gemaakt, dat Babes aether-extract gebruikte voor zijn proeven, terwijl Lederman zich bediende van de alcohol, waarin een lepreuze vinger bewaard werd.

Jeanselme en Vernes verrichten hun complementbindingsproeven met alcohol-aether-extract van leprabacillen.

In den laatsten tijd wordt ook pyridine-benzol-extract van t. b. c. bacillen gebruikt om complementbindingsproeven te verrichten met t. b. c. - en lepra-sera. Dit extract van Witebsky, Klingenstein en Kuhn werkt volgens Witebsky zoo goed, dat de reactie daarmede bij 15 leprozen 14 maal positief uitvalt, terwijl ze bij longen t. b. c. der volwassenen 80—90% positief aanwijst. Wij meenen dat op deze wijze bereid extract voor ons doel ongeschikt zal zijn, waar juist hier een verschil gezocht moet

worden tusschen de antigene eigenschappen van verschillende zuurvaste bacillen onderling en tegelijk ook een verschil tusschen de immuunstoffen in de sera van dieren ingespoten met de verscheidene zuurvaste bacillen of tusschen lepra- en t. b. c.-sera van patiënten onderling.

Op deze gronden viel onze keuze op het bereiden van een alcoholisch extract.

De lepra bacillen, die geëxtraheerd worden, zijn afkomstig van uitgesneden lepromen, die veel bacillen bevatten. Het weefsel wordt fijn geknipt en fijn gewreven in een mortier. Langzaam en roerende voegt men aqua dest. toe. De hoeveelheid hiervan behoeft niet bepaald te zijn, doch wel zoo, dat, wanneer men de suspensie van de leprabacillen en de weefselstukjes 15 minuten lang bij 500 toeren per minuut centrifugeert, een centrifugaat gevormd wordt van de grove partikeltjes met een opalescente vloeistof er boven op. Deze vloeistof, waarin de vrij liggende bacillen gesuspendeerd zijn, wordt overgeheveld in een andere buis, om dan flink gecentrifugeerd te worden gedurende $\frac{1}{2}$ uur bij 3000 toeren per minuut. Hierna wordt de vrij doorschijnende vloeistof uitgeheveld en het centrifugaat, dat grootendeels uit bacillen bestaat, wordt met aqua dest schoongewasschen. De verzamelde bacillen massa, zooveel mogelijk vrij van vloeistof, wordt in een andere reeds getarreerde buis gewogen. Verder wordt in de buis de vereischte hoeveelheid spiritus fortior (40 mgr. leprabacillen + 1 c.c. spir. fortior) langzaam en met platina lus de bacillen roerende, toegevoegd. Ten slotte wordt de alcoholische bacillen suspensie bij gewone kamertemperatuur bewaard.

Bij het verzamelen der bacillen hebben wij de methode van Steffenhagen, die de leproom na verwrijving, met 10% anti-formine behandelde, niet gevolgd, omdat wij den eventueelen invloed van deze eiwit oplossende stof willen vermijden.

Ook werden de leprabacillen niet eerst door verwarming gedood, om den slechten invloed van de hooge temperatuur op het antigeen te ontgaan.

De antigeen bereiding van de andere bacillen gaat gemakkelijker.

Bij de voorproeven hebben wij geen verschil kunnen constateeren of wij een cultuur in glycerine-bouillon of een cultuur uit Lubenau-voedingsbodem nemen.

Willen wij een groote hoeveelheid extract bereiden dan nemen wij een cultuur in glycerine-bouillon, gekweekt in jeneverflesschen. De cultuur, die zoowat 2 maanden oud is, wordt verzameld op een filtreerpapier. Daarna wordt de bacillenmassa in een getarreeerde wijdmondsche flesch met een geslepen stop gedaan, om gewogen te worden, terwijl de bacillenmassa gelijkmatig met een platina lus verdeeld wordt, met de verhouding van 20 mgr. bacillen op 1 c.c. spiritus fortior.

Bij het bereiden van het extract heeft men in aanmerking te nemen de verhouding van de bacillen tot de hoeveelheid alcohol en den duur van het extraheeren.

Om deze grootheden te kunnen bepalen, dienen voorproeven verricht te worden, waarbij wij het te onderzoeken extract laten inwerken op lepra- en contrôle-sera. Wijzen de uitslagen der proeven naar de goede richting, dan heeft men hieraan een houvast om de hoeveelheid extractie vloeistof en den duur van het extraheeren te bepalen. Langs dezen weg hebben wij de volgende verhouding gekregen van

40 mgr. leprabacillen in 1 c.c. spiritus fortior, en
20 mgr. andere „ „ „ met
2 weken als den kortsten duur der extractie

Langere duur van extraheeren geeft geen verandering in de sterkte van het antigeen.

Op deze wijze hebben wij verschillende soorten antigenen of alcoholische extracten bereid.

Het extract van leprabacillen is kleurloos; extraheert men langer dan 2 maanden dan heeft het een gelige tint. In zoutsol. verdund, blijft het kleurlooze extract helder; het andere daarentegen geeft een opalescentie.

Het extract van de bacillen Sidik is kleurloos en geeft geen opalescentie in zoutsolutie; evenmin geschiedt dit met het reeds gelig getinte extract van de bacillen van Tan A. Y. Het kleurlooze extract van de t.b.c. bacillen geeft ook geen opalescentie. Daarentegen geven de extracten van de runder- en vogel-t.b.c.-bacillen en de chromogene microorganismen wel troebeling in zoutsolutie.

Nu wij antigeen hebben, beginnen wij antisera tegen de verschillende zuurvaste bacillen te bereiden.

Konijnen, waarvan het serum geen antistoffen bevat tegenover de bovengenoemde bacillen, werden regelmatig eens per

week intraveneus in stijgende doses, ingespoten met bacillensuspensie, welke door verwarming 5 minuten in kokend water gedood zijn. Het eene konijn werd behandeld met leprabacillen, een tweede met den stam Sidik enz.

Bij het bereiden van de antisera, dient in het oog gehouden te worden het feit, dat het hier niet te doen is om hoogwaardige antisera doch hoofdzakelijk om zoo specifiek mogelijk immuunsera, zonder groepsantigeen te krijgen; doch het voorkomen van het ontstaan van groepsreacties is in vele gevallen niet mogelijk gebleken.

Ter illustratie diene de volgende tabel.

Het winnen van immuun serum.

Konijn No. 36 intraveneus ingespoten met bacillen van Tentu.				Complementbindingsproeven van serum konijn 36 vóór en gedurende de behandeling met de verschillende antigenen.						
dd.	hoeveelheid cultuur	dd.	serum-verdunning	Antigenen						
				Tentu	Sidik	t.b.c. 1773	Dinger cult. timothee b.	Rund t.b.c.	Kip t.b.c.	Controle 5 % alc.
27-4	nog niet ingespoten	27-4	1/10cc 1/40cc	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
9-5	1/5 lus									
14-5	1/3 „									
20-5	1 „									
		25-5	1/10 1/20 1/40	++ + —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —
25-5	1 1/2 lus	1-6	1/10 1/20 1/40 1/80 1/160	++++ ++++ ++++ ++ +	— + — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —	— — — — —
11-6	2 1/2 lus	16-6	1/10 1/20 1/40 1/80 1/160 1/320 1/640	++++ ++++ ++++ ++++ ++++ ++ —	++ + — — — — —	++ + ± — — — —	++ + — — — — —	++ + — — — — —	++ + ± — — — —	— — — — — — —

Hier moge volgen een korte beschrijving van de uitvoering der complementbindingsreactie.

Voor het verrichten van deze reactie hebben wij noodig:

- a. amboceptor
- b. schapenbloed
- c. complement
- d. antigeen (in ons geval verschillende soorten)
- e. de te onderzoeken antisera afkomstig van verschillende konijnen.

De bereiding van den amboceptor, het schapenbloed en het complement geschiedt zooals ze benoodigd zijn voor het verrichten van de Bordet-Wassermann's reactie, die verder, als bekend wordt verondersteld. Ook over het maken van het haemolytisch systeem, bestaande uit amboceptor en roode bloedlichaampjes, over het onderzoek naar de deugdelijkheid van den amboceptor, roode bloedlichaampjes en complement wordt hier niet uitgeweid.

De eerste stap die wij bij onze proeven doen, is het verrichten van de voorproef om te weten te komen de hoeveelheid antigeen, die wij later bij de hoofdproef zullen gebruiken.

Hiertoe worden van het te onderzoeken antigeen twee verdunningen gemaakt n.l. 1 : 10 en 1 : 20 met zoutsolutie. Nu nemen wij drie rekken met 11 buisjes en doen daarin van links naar rechts van het 5 % verdunde complement de volgende hoeveelheden 1 cc, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 en 0.1 cc. De hoeveelheid vloeistof in elke buis wordt aangevuld met zoutsolutie tot 1 cc. Ook de lege laatste buizen No. 11 worden met 1 cc zoutsolutie gevuld. Vervolgens voegt men in elke buis van het 1e rek 0.5 cc van het antigeen, verdund 1 : 10 en in het 2e rek 0.5 cc antigeen verdunning 1 : 20 en in het 3e rek 0.5 cc van de contrôle-vloeistof bestaande uit alcohol-zoutsolutie oplossing, ook 1 : 20. De buizen worden een $\frac{1}{2}$ uur lang in een waterbad van 37° gezet, waarna 1 cc haemolytisch systeem in elke buis gedaan wordt. Nogmaals worden de buizen een $\frac{1}{2}$ uur op 37° verwarmd, om dan afgelezen te worden.

Gewoonlijk wordt het bloed in de buizen in het 3e contrôle-rek gehaemolyseerd van links naar rechts tot en met de buis met 0.4 cc complement, dan volgt de buis met incomplete haemolyse, en ten slotte de laatste buis met een totale remming van haemolyse.

In het rek met antigeen verdunning 1 : 20 is de haemolyse in de meeste gevallen ook zooals in het 3e contrôle-rek, omdat het

antigeen haast geen complement bindt. Toch kan men zijn complement absorbeerende eigenschap herkennen, aan de buis met 0,3 cc complement; hier is n.l. de remming van haemolyse meer dan in de overeenkomstige buis in het contrôle-rek. De grens tusschen haemolyse en de remming der haemolyse is bij de proef met antigeen 1 : 10 verdund, naar links verschoven, omdat deze sterke antigeen-concentratie uit zichzelf veel meer complement bindt dan die van 1 : 20. In de laatste buis aan den rechterkant in het 1e en 2e rek moet een totale remming zijn; d.i. de contrôle, dat het antigeen uit zichzelf de roode bloed-lichaampjes niet haemolyseert.

Voor de hoofdproef moeten wij die dosis extract kiezen, die iets hooger complement bindt dan de contrôle met zout-solutie-alcohol.

Na het verrichten van zulke voorproeven hebben wij kunnen vaststellen, dat de beste extract verdunning is 1 extract + 19 zoutsolutie. Deze hoeveelheid geldt voor alle soorten extract.

Iederen keer als er konijnen antisera of later patiënten sera te onderzoeken zijn, wordt de benodigde hoeveelheid complement voor elk antigeen apart door z.g.n. complement titratie bepaald. Daar wij 8 antigenen, hierbij inbegrepen nog een contrôleoplossing bestaande uit 1 alcohol + 19 zoutsolutie hebben, zijn 8 rekken noodig voor de complement titratie. Omdat in het Afdelingslaboratorium Semarang het bloed voor het complement steeds afgetapt wordt van dezelfde groep cavia's, weten wij dat het complement meestal zoo sterk werkt, dat een hoeveelheid van minder dan 0.5 cc van 5 % voldoende is om 1 cc haemolytisch systeem op te lossen.

Op deze wijze behoeven wij voor elk extract slechts 5 buizen te hebben, die dan van links naar rechts gevuld wordt met 0.6, 0.5, 0.4, 0.3 en 0.2 van complementverdunning 1 : 20. Die hoeveelheden worden aangevuld met zoutsolutie tot 1 cc; daarop komt 0.5 cc extract of contrôle vloeistof. Na $\frac{1}{2}$ uur bebroeden wordt 1 cc haemolytisch systeem toegevoegd om dan weer $\frac{1}{2}$ uur bebroed te worden. Ten slotte wordt het afgelezen. Bereikt bij de proef met een bepaald extract de haemolyse de buis met 0.3 cc complement van 1 : 20, dan beteekent het dat 0.3 cc van 5 % complement in aanwezigheid van extract in staat is om 1 cc haemolytisch systeem op te lossen. Die hoeveelheid complement is gelijk aan 0.5 cc (de gebruikelijke volume hoeveelheid bij de

hoofdproef) van complement oplossing van 3 %. In de hoofdproef gebruiken wij er nog 2 % bovenop, zoodat volgens deze berekening de benoodigde complementverduunning in de hoofdproef met het gebruikte antigeen $3\% + 2\% = 5\%$ is.

Nu wij de dosis antigeen d.i. 1 : 20 en die van het complement d.i. 5 % hebben, kunnen wij verder gaan met het opzetten van de hoofdproef.

De geïnactiveerde konijnen-antisera zonder carboltoevoeging worden elk in de buizen zoo verdeeld, dat in de 1e buis 0.5 cc vloeistof komt met 1/10 cc serum, in de 2e 1/20 cc, in de 3e 1/40 cc in de 4e 1/80 cc serum komt enz. Hierop komt 0.5 cc complement van een boven bepaalde procentage en daarna 0.5 cc antigeen van 1 : 20. Na $\frac{1}{2}$ uur op 37° wordt 1 cc haemolytisch systeem in elken buis bijgedaan. Nogmaals worden ze $\frac{1}{2}$ uur bebroed om dan afgelezen te worden.

De uitslag van deze werkwijze, waarbij de konijnen antisera met de verschillende antigenen uitgetitreerd worden, is in de volgende tabel vastgelegd (bldz. 305).

Uit de tabel valt af te lezen, dat het lepra antigeen slechts goed reageert op lepra antiserum, iets minder op antiserum Sidik en weer minder op antisera t. b. c. 1773, runder t. b. c. en op antisera van chromogene bacillen. Het minst reageert het op het antiserum van vogel t. b. c. bacillen.

Hieruit valt weer af te leiden, dat de verwantschap van lepra antigeen tot dat van Sidik dichter is dan tot dat van de verschillende soorten t. b. c. bacillen.

Het antigeen Sidik reageert tot den eindtiter op de antisera der pathogene bacillen, doch slechts tot 1/16 titer van het antiserum Tentu en tot 1/4 titer van het antiserum timothee-bacillen.

Bijna precies hetzelfde als het antigeen Sidik, werken de antigenen van alle typen van t. b. c. bacillen.

Het antigeen-Tentu en -timotheebacillen werken heel sterk tot hun eigen antisera, echter onderling vertoonen ze slechts zwakke kruis-reactie. Daarentegen werken ze sterk met de antisera der pathogenen bacillen.

Is het lepra-antigeen vrij specifiek te noemen, het lepra antiserum daarentegen bindt alle antigenen bijna even sterk.

Het antiserum Sidik bindt het complement tot den eindtiter met de antigenen Sidik, t. b. c. 1773, vogel t. b. c. en de

Complementbindingsreactie met konijnen sera.

	Serum in cc	Antigenen							Contrôle alcohol zoutwater
		Lepra	Sidik	T. B. C. 1773	Rund T. B. C.	Kip T. B. C.	Tentu	Dinger timothee b.	
Antiserum lepra	1/10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
	1/20	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	—
	1/40	++	++	+	+	++	++	++	—
	1/80	+	+	+	+	+	+	+	—
	1/160	—	—	—	—	—	—	—	—
Antiserum Sidik	1/10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
	1/20	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
	1/40	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
	1/80	+	+++	+++	++	+++	+++	++	—
	1/160	—	+++	++	—	++	++	—	—
	1/320	—	—	—	—	—	—	—	—
Antiserum t.b.c. 47	1/10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
	1/20	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
	1/40	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
	1/80	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
	1/160	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
	1/320	—	+	+	+	+	+	+	—
	1/640	—	—	—	—	—	—	—	—
Antiserum Runder t.b.c.	1/10	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
	1/20	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
	1/40	+	+++	+++	+++	++	+++	+++	—
	1/80	—	+++	+++	+++	++	+++	++	—
	1/160	—	++	++	++	+	++	+	—
	1/320	—	+	+	+	—	+	—	—
	1/640	—	—	—	—	—	—	—	—
Antiserum vogel t.b.c.	1/10	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
	1/20	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
	1/40	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
	1/80	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
	1/160	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
	1/320	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
	1/640	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
	1/1280	—	+++	+++	+++	++	+++	+++	—
	1/2500	—	+++	+++	—	+++	++	+++	—
	1/5000	—	—	—	—	+	—	—	—
Antiserum Tentu	1/10	++	++	++	++	++	+++	++	—
	1/20	+	+	+	+	++	+++	+	—
	1/40	—	—	+	—	+	+++	—	—
	1/80	—	—	—	—	—	+++	—	—
	1/160	—	—	—	—	—	+++	—	—
	1/320	—	—	—	—	—	++	—	—
	1/640	—	—	—	—	—	—	—	—
Antiserum Dinger timothee bacillen	1/10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
	1/20	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
	1/40	+	+++	+++	++	+++	+++	+++	—
	1/80	+	++	+	+	++	+	+++	—
	1/160	—	—	—	—	+	—	+++	—
	1/320	—	—	—	—	—	—	+	—
	1/640	—	—	—	—	—	—	—	—

chromogene bacillen Tentu; met lepra-antigeen, runder t. b. c. en timothee bacillen tot den halven titer.

Het antiserum t. b. c. 47 reageert tot $1/4$ titer met lepra antigeen, tot $1/2$ titer met chromogene bacillen en tot den eindtiter met de andere antigenen.

Het antiserum runder t. b. c., is zooals het antiserum t. b. c. met enkele kleine verschillen.

Het antiserum vogel t. b. c. bacillen reageert haast niet op het lepra antigeen, doch met de rest gelijkmatig tot aan den eindtiter. De antisera Tentu en timothee bacillen werken sterk met hun eigen antigenen en veel minder met de andere antigenen.

Is uit de verkregen resultaten boven reeds vermeld, dat er een groote verwantschap bestaat tusschen lepra- en Sidik antigeen, dit laatste vertoont ook weer sterke verwantschap met alle drie soorten t. b. c. antigenen en omgekeerd. Daarentegen staan de chromogene bacillen geheel apart.

Tot zoover hebben wij onze proeven ingericht om de vraag te kunnen beantwoorden, of de bacillen van Sidik uit het bilabsces leprabacillen zijn.

Met deze complementbindingsproeven krijgen wij slechts een aanduiding, dat de stam Sidik tusschen de t. b. c. bacillen stammen en den leprabacil staat. Verder zien wij, dat konijnen antilepraserum even sterk al de andere soorten antigenen bindt, wat niet te verwonderen is, immers het konijn is ingespoten met leprabacillen, die slechts 5 min. in kokend water gedood zijn; zij zijn dan te vergelijken met volwaardig antigeen met al zijn samenstellende fracties. De bonte samenstellende bouwsteen van den leprabacil zijn natuurlijk ook terug te vinden in het bacillen lichaam van andere zuurvaste bacillen in den zelfden zin als het verschijnsel, dat wij zien bij de salmonella bacillen.

Dat antilepra-serum verschillende antigenen binden kan, is bovendien reeds eerder bekend naar aanleiding van de proeven van Goucher en Abrami, die gevonden hebben, dat menschenlepraserum een bindingsvermogen met allerhande antigenen bezit, zooals met de suspensie van typhus-, Friedländer-bacillen, staphylococcus aureus en van de gele sarcina.

d. Complementbindingsproeven met menschen sera.

Ofschoon dus de complementbindingsproeven met alcoholisch antigeen ons in het boven geschetste vraagstuk niet verder

kunnen brengen dan met de reeds verrichte proeven, hebben wij het onderzoek voortgezet met lepra patiënten sera in de hoop andere perspectieven te krijgen.

Het uitvoeren van de reactie geschiedt, zooals met de konijnen sera, doch met menschen serum wordt slechts met 1/10 cc serum gewerkt en het wordt verder niet uitgetitreerd. Met de sera wordt ook tegelijkertijd de reactie van Bordet-Wassermann met alcoholisch runderhart-extract verricht. Het aflezen van beide reacties geschiedt op dezelfde wijze.

Als antigenen gebruiken wij eerst lepra-, t.b.c. 1773 en Sidik antigenen. Het resultaat is in de volgende tabel (bldz. 308).

Met het opzetten van de bovenstaande proef willen wij nagaan of het lepra antigeen met menschen leprasera dezelfde reactie geeft als de t.b.c. en Sidik antigenen. Zooals uit de tabel te lezen is, zijn behoudens in enkele gevallen deze antigenen geheel met elkaar gelijk te stellen.

Daar het lepra antigeen heel moeilijk in groote hoeveelheden te bereiden is, worden bij de verdere proef met sera van leprozen gebruik gemaakt van de antigenen bereid van verschillende zuurvaste bacillen. Om nogmaals onderling te vergelijken, hebben wij de reactie verricht, zooals in de volgende tabel is verduidelijkt, zonder lepra-antigeen, terwijl het antigeen van timothee-bacillen bereid werden uit den gelen en witten stam en verder uitgebreid met antigeen Tan A Y, Tentu, Soekiban, Sarko, t.b.c. uit kip, uit pauw en uit runderen (tabel bldz. 309).

Uit het boven verrichte onderzoek is te concludeeren, dat het antigeen bereid van timothee-bacillen niet zoo gevoelig is als de andere, terwijl de antigenen Tan A Y, Tentu, Sidik, t.b.c. 1773, Soekiban en dat van runder t.b.c. II het beste resultaat aanwijzen.

Op grond hiervan gebruiken wij voor de verdere proeven met patiënten sera slechts de antigenen Tan A Y, Tentu, Sidik, Soekiban en t.b.c. 1773, apart of meerdere antigenen tegelijk.

In de eerste serie proeven vergeleken wij aan den eenen kant antigeen bestaande uit het alcoholisch extract alleen en aan den anderen kant antigeen bestaande uit het extract plus de bacillen suspensie. De uitslag hiervan was, dat er geen verschil bestond tusschen de twee antigenen, zoodat er afgeleid kan worden, dat de invloed van de bacillenlichamen als nihil beschouwd kan worden.

Vergelijkingsproef der antigenen.

No. uit patienten- boek	Initialen der patienten	Diagnose	Antigenen				Contrôle
			Lepra	t.b.c.	Sidik	Bordet Wasser- mann	
146	A	N ₂	—	—	+	—	—
147	K	N ₁	—	—	—	—	—
148	Mevr. G	C ₃	+++	+++	+++	+++	+++
149	S	N ₁₋₂	—	—	—	—	—
150	P	C ₃	—	—	—	—	—
151	R	N ₂	—	+	—	—	—
152	T	C ₃	+	+++	+++	—	—
153	R	C ₁	—	—	—	—	—
154	D	N ₂	—	—	—	+	—
160	S	C ₂₋₃	—	+++	+++	—	—
163	S	C ₂ N ₁	—	+++	+++	—	—
165	H	C ₂	—	—	—	+	—
166	R	N ₃	—	—	—	—	—
169	J	C ₃	+	+++	+++	+	—
176	K	C ₂ N ₁	+	+++	+++	++	—
174	S	C ₁ N ₂	—	—	—	—	—
176	K	C ₃	—	—	—	—	—
177	T	C ₂	—	—	—	—	—
178	G	C ₃ N ₁	—	+	+	—	—
179	H	C ₂ N ₁	—	+++	+++	—	—
41	S	C ₂	—	—	—	+	—
42	Tj	C ₂	+++	+++	+++	++	—
43	S	C ₃	+++	+++	+++	+++	—
44	W	C ₃	+++	+++	+++	++	—
45	P	C ₃	+++	+++	+++	+++	+
46	S	C ₃	—	—	—	+	—
47	O	C ₃	—	—	—	+	—
48	L	C ₃	+++	+++	+++	+++	+
49	H	C ₃	—	+	—	—	—
50	M	C ₃	+++	+++	+++	—	—
51	D	C ₃	+++	+++	+++	+++	—
52	L	C ₃	—	+++	+++	—	—
53	D	C ₃	+	+++	+++	+++	—
54	D	C ₂₋₃	—	—	—	—	—
55	T	C ₃	++	++	+++	++	—
56	X	C ₃	+++	+++	+++	+++	+
57	S	C ₃	—	—	—	+++	—
58	H	C ₃	+++	+++	+++	++	—
59	A	C ₃	+++	+++	+++	remt	+
60	P	C ₂	—	+	—	+++	—
61	T	C ₃	+	+++	+++	—	—
61	S	C ₂₋₃	—	+	—	—	—
63	P	C ₃	+++	++	++	+++	—
64	S	C ₃	—	—	—	—	—
65	G	C ₂	++	+++	++	++	—
66	H	C ₃	—	—	—	—	—
contrôle							
8 sera			—	—	—	positief	—
1 serum			—	+	+	"	++
2 sera			+	+	+	"	—
9 sera			—	—	—	negatief	—

Nogmaals vergelijkingsproef der antigenen.

Antigenen															
No.	Initialen	Diagnose	Tan A Y	Ten tu	Timothae		Sidik	T.b.c. 1773	Soe- ki- ban	Sar- ko	T.b.c. uit kip	T.b.c. uit pauw	T.b.c. uit rund	T.b.c. uit rund	Controle
					geel	wit									
6	R.	C ₃	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
7	K.	C ₃	++	+	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	-
8	S.	C ₃	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
9	I.	N ₂	+	-	-	-	-	-	+	-	++	+	-	-	-
10	W.	N ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	P.	N ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	T.	C ₃	+++	+++	+	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
13	M.	C ₃	+++	+++	+	±	+++	+++	+++	++	++	++	++	+++	-
14	T.	C ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	S.	N ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	K.	C ₁	+	+	-	-	+	+	-	-	±	-	-	±	-
17	A.	N ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	D.	C ₃	+++	+++	++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
21	R.	C ₃	+	-	-	-	+++	++	-	-	-	-	-	±	-
23	N.	N ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	K.	C ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	M.	N ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	T.	C ₃	++	++	+	-	+++	+++	+++	+	+++	++	++	+++	-
27	S.	C ₃	+++	++	±	-	+++	+++	+++	+	++	+	+	+++	-
28	W.	C ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	con- trôle geen lepra sera	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Wij hebben onderzocht sera van leprozen, van t. b. c. patiënten en sera voor Bordet-Wassermann's reactie niet van leprozen als contrôle.

De leprapatiënten waren afkomstig van de C. B. Z. en de lepra-poliklinieken Semarang, van de leprozerieën Pelantoengan, van de poliklinieken in het Regentschap Blora en uit de leprozerie Semaroeng te Soerabaja. De bloedmonsters van de laatste leprozeninrichting werden in venules naar Semarang verstuurd zonder vermelding van de diagnose der patiënten, van wie het bloed afgetapt was. De uitslag van het onderzoek is geheel gelijk te stellen met de onderzoeken der bloedmonsters der leprozen uit de buurt van Semarang. Het onderzoek van de sera uit de leprozerie van Semaroeng is tot stand gekomen door de medewerking van Dr. de Nooy en den Ind. arts Darwis.

Het resultaat is in tabelvorm gezet.

Het resultaat van de complementbindingsreactie van menschen sera met antigeen bereid van zuurvaste bacillen.

Diagnose	Aantal	Z. +		Z. $\pm$		Z. —		Eigen remming
		Aantal	%	Aantal	%	Aantal	%	
C ₁	9	7	77.8 $\pm$ 13.8	1	11.1 $\pm$ 10.4	1	11.1 $\pm$ 10.4	
C ₂	32	21	65.7 $\pm$ 8.4	1	3.1 $\pm$ 3.—	10	31.2 $\pm$ 8.1	
C ₃	107	85	79.4 $\pm$ 3.9	3	2.8 $\pm$ 1.6	19	17.8 $\pm$ 3.7	
	148	113	76.4 $\pm$ 3.5	5	3.4 $\pm$ 1.5	30	20.2 $\pm$ 3.3	
N ₁	17	3	17.6 $\pm$ 9.2	1	6 $\pm$ 5.8	13	76.4 $\pm$ 15.5	
N ₂	48	9	18.8 $\pm$ 5.6	1	2.1 $\pm$ 2.—	38	78.1 $\pm$ 5.9	
N ₃	73	9	12.3 $\pm$ 3.8	4	5.5 $\pm$ 2.7	60	82.2 $\pm$ 4.5	
	138	21	15.2 $\pm$ 3.—	6	4.3 $\pm$ 1.7	111	80.5 $\pm$ 3.3	
CN	78	61	78.2 $\pm$ 4.7	2	2.5 $\pm$ 1.2	15	19.3 $\pm$ 4.7	
Contrôle								
B-WR—	318	1	0.3 $\pm$ 0.3	1	0.3 $\pm$ 0.3	313	97.8 $\pm$ 0.8	5
B-WR $\pm$	184	19	10.3 $\pm$ 2.2	2	1.1 $\pm$ 0.7	149	80.9 $\pm$ 2.9	14
Tbc-Sera								
B-WR—	78	8	10.3 $\pm$ 2.2	1	1.3 $\pm$ 1.3	69	88.4 $\pm$ 3.8	
B-WR+	31	7	22.3 $\pm$ 7.4	1	3.2 $\pm$ 3.1	18	58.1 $\pm$ 88.—	5

Z = antigeen zuurvaste bacillen.

Wij hebben eerst gedacht, dat de graad van de ziekte invloed zou kunnen hebben op den reactiegraad en daarom worden de patiënten in de verschillende typen en graden gegroepeerd. Doch het aantal der vertegenwoordigers van sommige groepen is te gering om apart in beschouwing te worden genomen.

Zoo hebben wij slechts 9 C₁ en 17 N₁ gevallen, waardoor de procentage cijfers statistisch ongeschikt zijn om vergeleken te worden met die der andere C- en N-gevallen. Op deze gronden worden de cijfers gegroepeerd in die van C-, N- en CN-vormen.

De contrôle sera zijn genomen uit de voor de Bordet-Wassermann's reactie toegezonden sera en ook speciaal aangevraagde t. b. c. sera uit de C.B.Z. Semarang en uit het t. b. c. hospitaal voor gevangenen uit Ambarawa. Hierbij hebben de doktoren Mej. Flaumenhaft, Gafar en R. Soemakno hun medewerking verleend.

De verkregen cijfers der contrôles worden weer gegroepeerd in die met positieve en die met negatieve Bordet-Wassermann's reactie.

De uitslag wordt slechts uitgedrukt in negatief, twijfelachtig en positief; in deze laatste zijn ook begrepen de zwak- en de sterke positieven. Verder hebben wij bij de contrôle nog eenige eigenremmers.

Van de 148 C-gevallen was de uitslag bij 113 gevallen positief ($76.4 \% \pm 3,5$) bij 5 twijfelachtig ($3.4 \% \pm 1,5$) en bij 30 negatief ($20.2 \% \pm 3,5$).

Bij de N-gevallen zijn de cijfers omgekeerd n.l. van de 138 N-vormen reageerden slechts 21 sera positief ($15.2 \% \pm 3$) 6 sera twijfelachtig ($4.3 \% \pm 1,7$) en 111 sera negatief ($80.5 \% \pm 3,3$).

De uitslag der reactie bij de CN gevallen komt overeen met die der C-typen n.l. van 78 CN, 61 positief of $78.2 \% \pm 4,7$, 2 twijfelachtig of $2.5 \% \pm 1,2$ en 15 negatief of $19.3 \% \pm 4,7$.

Uit deze cijfers kunnen wij concludeeren, dat de complement-bindingsreactie bij de C en CN gevallen 76—78 % positief, 20 % negatief en 5 % twijfelachtig uitwijst, terwijl wij bij het N-type 15.4 % positieven, 80 % negatieven en 5 % twijfelachtigen uitslag krijgen.

Bij de contrôle Bordet-Wassermann negatieve sera is de complementbinding bij 97.8 % negatief, 0.3 % twijfelachtig en bij 3 % positief met 5 eigen remmers. De 2 niet negatief reageerende sera waren afkomstig van patiënten met gonorrhoe, zonder lepra noch t. b. c.-symptomen te vertoonen; daarbij dient opgemerkt te worden dat bij de eene de reactie slechts zwak positief en de andere twijfelachtig was.

Het lage positieve percentage bij de t. b. c. sera is wel te verwachten, omdat het antigeen, hetwelk juist complement bindt met de t. b. c. sera volgens Witebsky, Klingenstein en Kuhn in het alcohol-extract niet in die mate aanwezig is, zoodat deze onderzoekers hun antigeen bereiden uit de bacillen, die zij met heete alcohol gereinigd hebben. Daarentegen zouden volgens hen in het alcohol-extract zich juist stoffen bevinden welke reageeren op de lues-sera en wij zien ook hier, dat bij 10.3 % der Bordet-Wassermann positieve sera de reactie met ons antigeen positief uitvalt.

Vergelijken wij deze resultaten met die der andere onderzoekers.

Eitner was de eerste onderzoeker, die complementbindingsproeven met waterig extract van een huidleproom als antigeen verrichtte. Bij een lepra patiënt was de reactie positief.

Goucher en Abrami gebruikten bij hunne proeven ook waterig leproom extract en verkregen een positief resultaat bij 8 lepra tuberosa en bij een geval van zenuw lepra.

Sugai bediende zich eveneens van waterig leproom extract als antigeen; bij 7 lepromen viel de reactie positief uit.

Serra verkreeg met zijn lepra antigeen de navolgende uitslag:

6	positieven	van 6	huidlepra;
7	„	„	8 gemengde lepra en
2	negatieven	„	3 zenuwlepra.

Steffenhagen bereidde waterig lepra-extract na de leproom opgelost te hebben met antiformine. Daarmede kreeg hij 4 positieve reacties van de 5 leprasera.

Met hun waterig lepra antigeen kregen Biehler en Eliasberg zoowel bij huid- als bij zenuwlepra een positieve complement-bindingsproef. Het verschil der reactie bij die twee lepra typen is, dat zij bij de tubereuze lepra sterker is dan bij de lepra-anaesthetica.

Jeanselme en Vernes verrichtten de proef met alcohol-aether extract van gedroogd leproom en verkregen

6	positieven	bij 6	huid lepra en
1	positief	bij 4	zenuw lepra

Recio gebruikte alcohol-extract van leproom als antigeen en verkreeg van 14 tubereuze vormen 13 positieve en van 4 zenuw lepra slechts 1 positieve en 1 twijfelachtige en 2 negatieve reactie.

De resultaten van Baermann en Wetter, die ook alcoholisch leproom extract gebruikten, waren 70 % positief bij huid en 50 % positief (meestal zwak) bij de zenuwlepra.

Ofschoon dus de wijze van antigeen bereiding nogal verschillend is, is er toch een zekere overeenkomst op te merken tusschen de resultaten van Serra, van Jeanselme, Vernes en Recio eenerzijds en de onze anderzijds.

In de laatste jaren zijn deze proeven nogmaals door verschillende onderzoekers ter hand genomen, naar aanleiding van de vooruitgang in de bereiding van t.b.c. antigeen volgens Witebsky, Klingenstein en Kuhn. Dit antigeen, bedoeld voor het onderzoek van t.b.c. sera, bleek heel specifiek (in het kader

van groepspecifiek) in te werken op lepra-sera. Nadat Witebsky gewezen heeft op hun goede resultaten, wordt door Joshio Aoki en Kitoshi ook lepra-antigeen bereid in navolging van het voorschrift van Witebsky c.s. Als resultaat hebben de laatste onderzoekers in Japan bij 16 huidlepra 3 sterk positieve, 8 zwak positieve en 5 twijfelachtige bindingsreacties, bij 14 zenuwlepra viel de proef $1 \times$ sterk positief, $8 \times$ zwak positief, $3 \times$ twijfelachtig en $2 \times$ negatief uit.

Met Witebsky c.s. antigeen zijn de resultaten veel beter: n.l. sterk positieve reactie kregen zij bij 8 huidlepra en bij 9 zenuwlepra, terwijl slechts 1 huidlepra twijfelachtigen uitslag gaf.

Ook Brant werkte met Witebsky antigeen met een bevredigend resultaat: n.l. 50 positieve bij 50 huidlepra, 4 positieve bij 4 gemegd en 20 positieven bij 26 zenuwlepra.

Otto G. Bier en Käte Arnold werkten ook met antigeen van Witebsky c.s. bij een paar honderd leprozen en verkregen een resultaat als in de volgende tabel.

Klinische vormen	Aantal	Positief	
		aantal	%
nervosa	14	8	57.1
cutana	31	29	93.5
mixta	155	146	94.2
insipiente gevallen	72	32	44.4

Uit de resultaten van verschillende onderzoekers is te concludeeren dat voor het stellen van de diagnose lepra de complementbindingsreactie met het antigeen Witebsky c.s. van groote beteekenis is.

Werkt ons antigeen niet zoo gevoelig als dat van Witebsky c.s., toch kan met het door ons bereide alcoholische extract van lepra of t.b.c. bacillen een reactie verricht worden, die in bepaalde gevallen voor de differentieel diagnose tusschen de huid- en gemengd lepra eenerzijds en zenuwlepra anderzijds van belang kan zijn, naar gelang de reactie positief (76—78 % bij de eerste twee typen) of negatief (80 % bij het laatste type) uitvalt.

Verder kunnen wij daarmede aantonen, dat er een biochemisch verschil bestaat tusschen de typen huid- en gemengd-lepra aan den eenen en het type zenuwlepra aan den anderen kant.

II. Vergelijking tusschen de resultaten der complementbindings-reactie met extract van zuurvaste bacillen en die met alcoholisch extract van runderhart bestemd voor Bordet-Wassermann's reactie met theoretische beschouwingen.

In een laboratorium, waar het verrichten van de Bordet-Wassermann's reactie tot het routine werk behoort, is het wel haast vanzelfsprekend, dat wij de sera, bij welke de reactie met zuurvaste bacillen-extract gedaan wordt, ook toetsen aan de reactie van Bordet-Wassermann. Doch onmiddellijk laten wij hierop volgen de mededeeling dat wij bij de leprozen met positieve Bordet-Wassermann's proef niet nagaan, of ze wel lues of framboesia hebben. Wij hebben ons beperkt tot het verrichten der twee reacties bij de sera.

Reeds in 1906 heeft Eitner op het feit gewezen, dat leprasera positief reageeren op antigeen bestemd voor Bordet-Wassermann's reactie. Sedert dien wordt de proef door vele onderzoekers herhaald en uitgebreid; zij konden over het algemeen Eitner bevestigen.

Statineanu en Danielopoulo gebruikten syphilis-leverextract en kregen 11 positieve reacties bij 21 sera.

Georg Meier bediende zich van waterig luetisch leverextract. Zijn resultaat was $9 \times$ positief bij 13 huidlepra en $10 \times$ negatief bij 12 zenuwlepra.

Ook Bruck en Gessner hebben zoowat dezelfde verhoudingen gekregen n.l. 5 positieven bij 7 huidlepra en geheel negatieven bij 3 maculo-anaesthetische lepra.

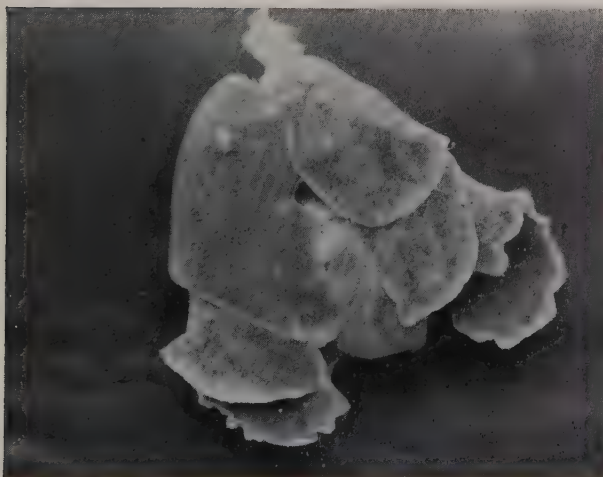
Het is ondoenlijk om alle schrijvers (o.a. Akerberg, Almkvist en Jundell, Azua en Covisa, Ehlers en Bourret, Wechselmann en G. Meier), die de reactie van Bordet-Wassermann bij lepra beproefd hebben, aan te halen.

Het is wel op te merken, dat de eerste onderzoekers niet vermeld hebben of hun procentage positieve cijfers niet beïnvloed zou kunnen zijn door het bestaan van menginfectie met syphilis bij de leprozen.

Zuivere berekening hebben Baermann en Wetter in 1910 getracht te bereiken door ook het procentage van de Bordet-Wassermann positieven bij de contrôle niet-lepreuze personen te bepalen en dit getal van het procentage positieve reactie bij de



Zwarte aap (*Semnopitecus maurus*) submucous ingeënt op den bodem
van de rechter neusopening.



Rechter bovenkwab pneumonie bij de, met bacillen Sidik uit bilabsces
geënte *Semnopitecus maurus*.

leprozen af te trekken. Deze onderzoekers gebruikten alcoholisch lues-leverextract als antigeen en verkregen bij 124 tubereuze en gemengde vormen 80 of 65% en bij 16 zenuwlepra slechts 8 of 50% positieve reactie. Dit percentage dient met 25% verminderd te worden, omdat 25% der contrôles niet-leprozen, positieve Bordet-Wassermann vertoonden.

Daarna publiceerde Bloomberg in 1911 het resultaat van zijn onderzoek over deze reactie bij syphilis, lepra en framboesia met de opmerking, dat de positieve Bordet-Wassermann bij leprozen ook veroorzaakt kon worden door lues of framboesia, vooral in streken waar framboesia veel voorkomt. Volgens Muir is het niet zelden gebeurd, dat latente lepra ten gevolge der complicatie met syphilis tot manifestatie komt.

Betreffende de techniek wees Schüffner er op, dat het alcoholische hartextract te prefereeren is boven het waterige hartextract, omdat het eerste minder de onspecifieke reactie met leprasera vertoont dan het tweede.

Kolmer daarentegen trachtte antigeen te bereiden bestaande uit alcoholisch extract zonder toevoeging van cholesterine of lecithine en het complement te doen binden gedurende 18 uren op 6° Celcius, met het doel om alleen reactie te krijgen met lues, doch niet met lepra sera. Met deze methode verkregen Kolmer en Denney geheel negatieve reacties bij 125 lepra, die niet aan lues leden; bij 27 leprozen met syphilis was de reactie positief. Negatief was de reactie bij 6 leprozen, bij wie syphilis slechts vermoed werd. Deze methode van onderzoek zou volgens de beide onderzoekers een even specifieke uitslag geven als de reactie van Kahn.

Ook Pineda en Roxas Pineda pasten Kolmer's methode toe bij 250 leprozen, die klinisch, noch anamnestic aan lues of framboesia leden, en vonden slechts bij 18 patiënten of 7.2% positieve reactie.

Later trachtten deze onderzoekers de complicatie met syphilis of framboesia aan te toonen door de toepassing van de reactie van Kahn, die alleen positief zou reageeren op de compliceerende spirochaeten infectie. Deze meening is echter niet door Ryrie, Lampe en door Soule gedeeld.

In dezelfde inrichting waar Pineda en Roxas Pineda hun onderzoekingen verricht hebben, paste Soule de complement-bindingsreactie volgens Kolmer en daarnaast ook de reactie

van Kahn toe. Hij kreeg bij 615 sera van huidleprozen zonder lues, $109 \times$ sterk en $5 \times$ positief of 18.5 % met methode Kolmer en verder $121 \times$ sterk en $70 \times$ positief of 31 % met methode Kahn. De percentages zijn bij 54 leprozen in het reactie stadium nog hooger n.l. respectievelijk 35.2 % en 33.4 %.

Welke beteekenis men de reactie van Bordet-Wassermann bij de lepra ook toekent, hebben vele onderzoekers wel overeenkomende resultaten in dien zin, dat de percentages der positieve reactie bij de huid- of gemengde lepra grooter is dan bij de zenuwlepra. Onze cijfers, verduidelijkt in de volgende tabel, kunnen zich wel aansluiten bij die der vele onderzoekers.

Vergelijkende resultaten der reacties met antigeen zuurvaste bacillen en met hart extract voor Bordet-Wassermann.

Typen	Aantal	Z + BW -	Z + BW +	Z - BW -	Z - BW +	Z + BW ±	Z ± BW +	Z ± BW -	Z +	BW +
C ₁	9	4	2	1	—	1	—	1		
C ₂	32	13	8	9	1	—	1	—		
C ₃	107	41	43	17	2	1	—	3		
C	148	58	53	27	3	2	1	4	113 of 76,4 %	57 of 38,5 %
N ₁	17	2	1	12	1	—	—	1		
N ₂	48	4	3	33	5	2	1	—		
N ₃	73	7	2	48	12	—	3	1		
N	138	13	6	93	18	2	4	2	21 of 15,2 %	28 of 20,3 %
CN	78	33	24	14	1	4	1	1	61 of 78,2 %	26 of 33,3 %
Totaal	364	104	83	134	22	8	6	5	195 of 53,5 %	111 of 30,5 %

Wij krijgen n.l. bij 148 C gevallen $57 \times$ of 38.6 % positieve Bordet-Wassermann; bij 78 CN gevallen is het cijfer iets hooger n.l. $26 \times$ of 43.6 %; daarentegen kregen wij bij de 138 N gevallen slechts $28 \times$ of 20.3 % positief.

Ofschoon wij boven reeds melding hebben gemaakt, dat wij geen onderzoek verricht hebben, in hoeverre de onderzochte leprozen ook complicatie met lues of framboesia hebben, toch kunnen wij tot een conclusie komen, wanneer men het volgende feit in aanmerking neemt.

In 1936 werden $16002 \times$ bloed naar het Afdeellingslabora-

torium van Semarang gestuurd ter onderzoek op de reactie van Bordet-Wassermann. Er werd zeker bij de patiënten, van wie het bloed ter onderzoek is gestuurd, gedacht aan infectie met lues of framboesia. Van 16002 sera was de reactie bij 6323 positief of 39.5 %.

Hier is het percentage der positieven haast gelijk met dat bij de huid- en de gemengde-lepra. Het is daarom wel haast niet aannemelijk dat de hooge percentages der positieve reactie bij C en CN lepra-gevallen veroorzaakt zouden worden alleen door de compliceerende spirochaeten infecties, ofschoon het voorkomen hiervan bij een zeker gedeelte der door ons onderzochte leprozen niet te ontkennen is.

Houden wij dit feit voor oogen dan komen wij evenals Lampe, Ryrie en Soule tot de overtuiging, dat lepra alleen, tot een zeker percentage ook wel positief met lues reacties reageeren kan.

Hier constateeren wij, evenals de vroegere onderzoekers, het grooter percentage der positieve Bordet-Wassermann's reacties bij de C en CN gevallen dan bij de N vormen; toch zijn de cijfers bij de huid- en gemengde typen weer belangrijk kleiner, dan die verkregen bij de proeven met gebruikmaking van extracten der zuurvaste bacillen.

Nu wij de resultaten van onze complementbindingsproeven in verband met de lepratypen gerangschikt en voorzien van enkele beschouwingen gegeven hebben, meenen wij volledigheidshalve de resultaten van een theoretisch standpunt ook te moeten bekijken. Daartoe dienen wij uit te gaan van de bereide antigenen.

Het eerste antigeen bestaande uit het alcoholische extract van zuurvaste bacillen, bevat behalve de in oplossing overgegangene vetachtige of lipoidachtige niet specifieke bestanddeelen dezer microorganismen, ook de specifieke stoffen aan deze zuurvaste bacillen eigen. Wel meent Prausnitz dat alcoholische extracten slechts de onspecifiek werkende bindingsstoffen bevatten, waarom hij juist de alcoholwasschingen voor het reinigen der specifieke antigenen aanbeveelt; doch de onderzoekingen van K. Meier, Much, Citron, enz., wijzen op het tegendeel en H. Sachs komt tot de conclusie, dat bacteriën ook lipoiden bezitten, die deels onspecifiek, deels specifiek en zelfs soms soort specifiek werken.

De aanwezigheid van de lipoidachtige lichamen in het extract, in het eene meer dan in het andere, is te vermoeden, door het ontstaan van opalescentie bij het samenbrengen van het extract met zoutoplossing. Deze onspecifiek werkende lipoiden zijn volgens Witebsky c.s. en Blumenthal de lastige stoffen, die bij hun onderzoekingen gericht op het zoeken naar een geschikt antigeen om met t. b. c. sera te doen reageeren, parten spelen, omdat deze stoffen ook complement absorbeeren in samenwerking met lues sera, wat ons antigeen met 10.5 % dezer sera ook doet.

De voor de zuurvaste bacillen specifieke lichamen reageeren daarentegen slechts op een groep immuunstoffen, welke in het lichaam tot stand gebracht worden tengevolge van de innesteling of injecties van zuurvaste bacillen.

Zooals wij boven bij de reeks proeven met konijnen gezien hebben, welke ingespoten zijn met zuurvaste bacillen, reageeren de sera der proefdieren op ons antigeen. Deze reactie kunnen wij beschouwen als een specifieke binding van antigeen en antistoffen. Daarentegen kunnen wij deze reactie niet identiek achten met de positieve complementbindingsproeven bij 10.5 % der Wassermann-positieve controle sera bij gebruikmaking van hetzelfde extract. Deze laatste worden tot de onspecifieke labiliteitsreacties gerekend, waarvan het ontstaan te danken is aan de labiliseering der eiwitlichamen, een verschuiving van albumine-globuline spiegels ten gunste van de globuline. Deze toestand is te vinden niet alleen bij verschillende chronische ziekten met weefselverval zooals bij carcinoom, lues, lepra t. b. c., doch ook bij graviditeit. De in labiele toestand verkeerende globuline moleculen klonteren onder invloed van de toevoeging van voor deze reactie geschikt gemaakte lipoiden samen, soms tot zichtbare vlokken, die dan tegelijk het complement binden.

Boven is met een enkel woord aannemelijk gemaakt, dat de reacties met de konijnen sera teweeggebracht zijn door specifieke immuunstoffen; vooral als men ook analoge voorbeelden vindt zooals bij het bereiden van konijnen immuunsera voor diagnostische doeleinden tegen andere microorganismen, is de verklaring zeer plausibel. Bovendien hebben wij een werkmethode gevolgd, waarbij de sera tot den eindtiter verdund worden. In deze minimale hoeveelheden sera zou volgens H. Sachs de onspecifieke labiliteitsreactie te verwaarlozen zijn.

Is dan de reactie nu met sera der leprozen, in wier lichaam reeds jarenlang de zuurvaste bacillen zich genesteld hebben met de optredende verschuivingen van globuline-albumine waarschijnlijk ook van lipoiden spiegels in het bloed, wel gelijk te stellen met de reactie bij de sera der konijnen, die slechts een paar maanden behandeld zijn met doode zuurvaste bacillen?

Om deze vraag te beantwoorden hebben wij gemeend een proef op te zetten, die door H. Sachs, Klopstock en Takenomata aanbevolen wordt om de specifieke van de onspecifieke complementbindingsreactie te kunnen onderkennen.

Volgens Takenomata zou de labiliteitsreactie uitgeschakeld kunnen worden als de te onderzoeken sera verwarmd worden op 62° — 65° . Deze methode achten wij ongeschikt voor de toepassing, omdat sommige lepra sera en ook lues sera bij deze temperaturen reeds dik vloeibaar worden.

De andere methode, ook door H. Sachs c.s. aanbevolen ter voorkoming der onspecifieke reactie is het inwerken van antigeen, complement en het te onderzoeken serum te doen plaatsgrijpen op temperatuur van 0° . Kolmer daarentegen laat de reactie 18 uren bij 6° verlopen.

Nu hebben wij deze proef verricht, waarbij de inwerkingsduur slechts $2\frac{1}{2}$ uur was bij 0° . Het resultaat hiervan is als volgt:

De proef op de specificiteit der complementbindingsreactie.

No.	Initialen	Diagnose	Serum + compl. + antigeen $\frac{1}{2}$ uur op 37°			Serum + compl. + antigeen $2\frac{1}{2}$ uur op 0°		
			Antigenen		Controle	Antigenen		Controle
			Sidik	Tentu		Sidik	Tentu	
1	Sa	C_3N_3	+++	+++	—	+++	+++	—
2	Ta	C_3N_3	+	++	—	+	+	—
3	Tad	C_3	+++	+++	—	±	±	—
4	Do	N_3	—	—	—	+	—	—
5	To	C_3	—	—	—	—	—	—
6	Ser	C_3	+++	+++	—	+++	++	—
7	Sam	C_3	—	—	—	—	—	—
8	Sarm	C_3	+++	++	—	+	+	—
9	Soe	C_2	+	+	—	++	±	—
10	Mak	C_2	+	+	—	++	±	—
11	O	C_3	+++	+++	—	+++	+	—
12	Koes	N_8	—	—	—	—	—	—
13	Soek	N_3	—	—	—	—	—	—
14	W	C_1	—	—	—	—	—	—
15	Goet	C_3	+	—	—	—	—	—
16	Ho	C_2	+++	+	—	+	—	—

Bij het bekijken dezer tabel dient in aanmerking te worden genomen, dat het antigeen Sidik belangrijker is dan dat van Tentu-bacillen, omdat deze laatste volgens de cultuureigenschappen tot de saprophytische zuurvaste bacillen behooren.

In de beide kolommen van antigenen Sidik zien wij bij sera No. 1, 5, 6, 7, 11, 12, 13 en 14 geen verschil betreffende den uitslag; bij sera no. 3, 8, 15 en 16 is de reactie op 37° sterker dan op 0° , daarentegen bij sera no. 4, 9, 10 is zij op 0° beter dan op 37° .

Volgens de zienswijze van H. Sachs zou dan de binding van antigeen Sidik met de lepra sera bij onze proeven als specifieke immuniteits reactie te beschouwen zijn. Deze binding geschiedt soms op 0° beter dan op 37° (bij sera no. 4, 9 en 10). Dit verschijnsel is ook eerder door H. Sachs opgemerkt.

Dat daarbij de onspecifieke labiliteits reactie ook een rol speelt, ofschoon heel gering, zien wij in het feit, dat de reactie bij sera no. 3, 6, 15 en 16 op 37° sterker is dan op 0° .

Wanneer men het resultaat van de proeven met het antigeen Tentu op de beide temperaturen vergelijkt, dan is het opmerkelijk, dat de reactie op 0° vrijwel bij alle positief reageerende sera belangrijk minder is dan op 37° , waaruit geconcludeerd kan worden, dat de invloed van de labiliteitsreactie hier grooter is dan bij het antigeen Sidik.

Bij het aannemen van het bestaan van specifieke en onspecifieke complementbinding bij gebruikmaking van alcoholisch extract van zuurvaste bacillen en op grond van onze proeven bij de temperaturen van 0° en 37° kunnen wij de gevolgtrekking maken, dat al de positieve proeven met de antigenen, bereid van zuurvaste bacillen op al de lepra sera hoofdzakelijk teweeggebracht worden door de specifieke immuniteitsreactie en slechts voor een gering deel tot stand gebracht door de onspecifieke labiliteitsreactie.

Tot dezelfde conclusie n.l. dat de binding van Witebsky-antigeen met lepra sera te beschouwen is als die tusschen werkelijk antigeen-antilichaam, komen ook Otto G. Bier en Käte Arnold als zij de reagenten in lepra serum met het genoemde antigeen konden absorbeeren, ofschoon de methode van onderzoek wel valt te becritiseeren.

Gaan wij nu over tot het beschouwen van de Bordet-Wassermann's reactie bij de lepra.

Het door ons gebruikte antigeen is het alcoholische extract van een normaal runderhart met toevoeging van cholesterine.

Het vermogen van dit orgaanextract om complement te binden is volgens H. Sachs toe te schrijven:

1. aan het gehalte aan specifiek antigeen en door de aangegane reactie met specifieke lichamen;
2. aan het gehalte aan lipoid antigeen, dat inwerkt op lipoid antilichamen, zooals het geschiedt bij de binding met menschen luessera;
3. aan het gehalte aan pseudoantigeen, dat een reactie aangaat met de in labile toestand verkeerende globuline.

De door ons verrichte proeven van Bordet-Wassermann door de inwerking van het alcoholische runderhartextract met de sera der leprozen kunnen onmogelijk gerekend worden tot sub 1; hiermede wordt immers bedoeld een reactie, welke zou ontstaan door de binding van het antigeen, in ons geval bereid van runderhart, met antiserum verkregen van proefdieren na inspuiting met materiaal van hetzelfde hart.

Aan den anderen kant, gezien het feit, dat leprasera binding kunnen aangaan met verschillende antigenen (Gaucher, Abramie) welke met leprabacillen niets te maken hebben, kunnen wij onmiddellijk de meening onderstrepen, dat de reactie van het hartextract met de leprasera behoort tot de onspecifieke labiliteitsreacties, indien de patiënt, van wien het serum onderzocht wordt, alleen aan lepra lijdt, welke niet gecompliceerd wordt door lues of framboesia.

Hebben de te onderzoeken sera lues- of framboesia-reaginen, dan rekent H. Sachs de reactie niet meer tot de onspecifieke reacties, doch tot de inwerking van lipoidantigeen op lipoidantilichamen. Deze opvatting is gegrond op de opvatting van autoantilichaamvorming, een theorie die eerst door Weil en Braun geponeerd wordt. Door de belangrijke proeven van Sachs, Klopstock en Weil, wordt aannemelijk gemaakt, dat gedurende de infectie met lues (of framboesia) waarbij de lichaamscellen gedestruëerd worden, de vrij geworden lipoiden zich met de afbraakproducten der spirochaeten binden tot volwaardig antigeen, dat weer inwerkt op het lichaam, waardoor antistoffen gevormd worden. De vrij gekomen lichaamslipoiden ontstaan bij de cellenaafbraak, zouden dan teruggevonden worden in de extracten van de hartspieren. Dit extract, door Landsteiner

hapteten genoemd is in staat een binding aan te gaan met lipoid antistoffen (reaginen) in het luesserum, zooals wij zien bij Bordet-Wassermann's reactie.

Deze voorstelling van zaken is belangrijk verduidelijkt geworden door de grondige studie van Forssman's heterogeneitisch antigeen door Landsteiner c.s. verricht.

Daar onder de paar honderd onderzochte leprozen, zeker patiënten aanwezig zijn, die behalve lepra ook lues of framboesia hebben is de positieve Bordet-Wassermann's reactie bij deze personen te beschouwen als de inwerking van lipoidantigeen op lipoidantilichamen volgens H. Sachs.

Wanneer wij de belangrijke totalen der cijfers van de tabel (pag. 316) bekijken, dan zijn van 364 leprasera

- A 104 sera alleen positief met antigeen bereid van zuurvaste bacillen en negatief met runderhart extract; dit beteekent, dat in de sera slechts antilichamen tegen zuurvaste bacillen aanwezig zijn met een gering gehalte aan de onspecifiek reageerende globulinen, die zich met de onspecifieke deelen van hetzelfde antigeen binden; lues of framboesia reaginen zijn hier afwezig.
- B 83 sera positief met beide antigenen; deze reactie is toe te schrijven aan:
 - I antistoffen en globulinen zooals bij sub A en daarenboven het voorkomen van lipoidantistoffen (H. Sachs) in een gedeelte der sera afkomstig van leprozen, die met lues of framboesia behept zijn;
 - II antistoffen en globulinen zooals bij sub A en daarenboven dat nog andere in labielen toestand verkeerende globulinen, welke met het hartextract een onspecifieke reactie vormen; deze sera zijn afkomstig van leprozen zonder complicatie.
- C 22 sera negatief met het zuurvaste bacillenextract en positief met het hartextract, dit is toe te schrijven aan:
 - I de afwezigheid van in sub A genoemde antistoffen en globulinen, doch aan het voorkomen van lipoidantistoffen (H. Sachs) in een gedeelte der sera afkomstig van leprozen, die bovendien aan lues of framboesia lijden;
 - II de afwezigheid van in sub A genoemde antistoffen en globulinen, doch aan het voorkomen van onspecifiek

reageerende globulinen op orgaanextracten; deze sera zijn afkomstig van leprozen zonder complicaties.

D 134 sera negatief met beide antigenen; deze zijn vrij van reaginen.

Wat verder gevonden zal worden in de rest der sera is af te leiden uit het bovenstaande.

Uit het resultaat van boven verricht onderzoek kunnen wij tot het besluit komen, dat in de leprasera verschillende antilichamen en verschillende in labiele toestand verkeerende globulinen naast elkaar voorkomen.

In groote lijnen bij het verklaren van de reactie van Bordet-Wassermann voldoet de theorie van H. Sachs c.s. uitstekend; ondanks dat is toch de immuniteitstheorie (*sensu strictiori*) en de chemisch-physische theorie nog niet geheel van de baan.

Samenvatting en Conclusie.

Bij een lepra patiënt, type N₃ met positief leprabacillen in het neusslijm, d.d. 11 Mei 1932, in de C.B.Z. Semarang opgenomen, die behandeld werd met intramusculaire inspuiting van chaulmogra olie en later geïodeerde aethylester-chaulmograe, ontwikkelde zich ultimo Juli op de entplaats een bilabsces. Het puctaat hiervan, dat vol met zuurvaste bacillen zat, werd in cultuurmedia (Lubenau, Sauton en Kirchner) geënt en bij caviae ingespoten.

Na twee weken bebroeden werd een welige groei op de Lubenau voedingsbodem en iets minder op die van Kirchner geconstateerd, waardoor bij ons onmiddellijk de vraag opkwam: „Hebben wij hier met lepra- dan wel met t. b. c. bacillen te doen?”

Op grond hiervan werd nauwkeurig nagegaan of de patiënt ook niet aan t. b. c. leed.

De Röntgen-foto van het bekken vertoonde een opheldering vermoedelijk van het os ilium bij de articulatio iliosacralis. Hier werd gedacht aan t. b. c. caries. Het bilabsces zou dan een verzakkingsabsces, afkomstig van dat proces, kunnen zijn.

Doch de mogelijkheid was ook niet uitgesloten, dat het bilabsces door de woekering van leprabacillen ontstond, die, afkomstig van de neus, door de bloedbaan verspreid zijn.

Ultimo September 1932 waren in de longtoppen crepitatie en

op den rug overal ronchi gehoord. Het sputum bevatte nog geen zuurvaste bacillen.

Drie maanden later in December 1932 werden de longafwijkingen duidelijker. De Röntgenfoto vertoonde in beide longen uitgebreide kleine ronde vrij scherp omschreven vlekjes egaal verspreid, die hier en daar met elkaar conflueeren. Het geheel had het aspect van een honingraat.

Het sputum bevatte nu zuurvaste bacillen.

Een cavia hiermede intraperitoneaal en twee cavia's subcutaan en intramusculair ingespoten na observatietijd van $\frac{1}{2}$ tot 1 jaar, vertoonden geen afwijkingen in de organen. Een passageproef met fijn geknipte longen en liesklieren van één dezer caviae en ingespoten bij een vierde cavia gaf afwijkingen in het laatste proefdier te zien, die lijken op t. b. c. veranderingen.

In Februari 1933 kreeg de patiënt aan beide liezen bubo-adenitis veroorzaakt door zuurvaste bacillen, die overging in verweeking.

In April 1933 vertoonde de patiënt haematurie met zuurvaste bacillen in de urine. De cavia met de urine ingespoten succombeerde met zuurvaste bacillen in de longen en liesklier. Hier is derhalve een duidelijk positieve caviaproef op t. b. c. bacillen.

De toestand ging langzaam achteruit en de patiënt stierf op 19 December 1933.

De reactie van von Pirquet tijdens het leven verricht, was positief, die door ons van weinig waarde geacht wordt.

In de periode vanaf begin van de opname ultimo Mei 1932 tot aan de ontwikkeling van het bilabsces in September 1932 was het lichaamsgewicht van den patiënt slechts van 47,8 KG tot 47,2 KG gedaald. Hierna ging het gewicht in September 1933 d.i. dus een jaar later, langzaam achteruit tot 42,5 KG.

De temperatuur en pols waren, tot de vorming van het bilabsces steeds normaal. Hooge temperaturen had de patiënt nooit gehad, behalve op 4 December 1933, toen de temperatuur tot 39° steeg.

De bloedbezinking was onafgebroken hoog, boven 63.

Bij de sectie waren gevonden: atrophische tong, een dubbeltje groote ulcus op de epiglottis, een cent groote carverne in de linkerbovenkwab van de long met overal verspreide grijze bronchogene haardjes, vergroeiingen van de longen met de borstkas, vergroote bronchiale lymphklieren; lever met hobbelig

oppervlak met vaste consistentie; de linker nier was verschrompeld, bij doorsnede geelwitte haarden te constateeren.

Bij histologisch onderzoek zijn tuberkels gevonden in de longen, lever en in de linker nier.

De cavia ingespoten met het longmateriaal succombeerde met orgaanveranderingen als door t. b. c. bacillen veroorzaakt. De milt is 34.55 gr. zwaar.

Een stam van zuurvaste bacillen werd ook uit het longmateriaal van Sidik gecultiveerd.

Wij hebben derhalve twee stammen van zuurvaste bacillen culturen van patiënt Sidik

1e. uit het bilabsces en

2e. uit de longen.

De cultuureigenschappen der beide stammen op Lubenau, Sauton, glycerinebouillon voedingsbodem en de morphologie der bacillen gelijken op die der gewone t. b. c. bacillen.

Daarentegen is er wel een groot verschil in pathogeniteit tegenover cavia tusschen de beide stammen te constateeren.

De directe subcutane en intramusculaire entingen met de stam uit het bilabsces verwekten bij de caviae slechts een locale abscesvorming met verdikking der regionale klieren; ook intraperitoneale inspuiting gaf bij de cavia geen ziekte verschijnselen. Toch is het gelukt om de virulentie voor de cavia te verhoogen na het passeeren van de witte muis. Dit feit doet denken aan de proeven van Thiroux, die als passage proefdier een konijn gebruikte.

In tegenstelling daarmede bracht de stam uit de longen de caviae, die daarmede geënt zijn, zonder uitzondering ruim 6 maanden na de infectie tot den dood met veranderingen in de longen en lever als door t. b. c. bacillen veroorzaakt. Daarbij kon de milt sterk vergroot zijn tot een gewicht van 10,8 gr.

De voor de cavia avirulente stam is wel pathogeen voor een witte muis en voor de zwarte aap (*Semnopithecus maurus*) doch verder apathogeen voor kippen, konijnen, witte rat en voor de grijze aap (*Mac. Cynomolgus*).

De antigene eigenschappen van de stam Sidik uit het bilabsces werden vergeleken met die van leprabacillen, van verschillende t. b. c. bacillen-stammen en ook met zuurvaste saprophytische bacillen.

Het bouillonfiltraat gebruikt voor de allergische reactie werkte sterker dan het leproom-extract volgens Mitsuda.

De antigene eigenschappen der bacillen Sidik bij kruis-complementbindingsreactie met immuunsera, verkregen door konijnen in te spuiten met verschillende zuurvaste bacillen wezen uit, dat de bacillen Sidik dichtere verwantschap tot de lepra-bacillen vertoonden dan de andere zuurvaste bacillen.

Verder werden de antigenen, bereid van verschillende zuurvaste bacillen, getoetst op menschen sera afkomstig van leprozen, tuberculeuze patiënten en sera bestemd voor Bordet-Wassermann's reactie.

Ten slotte werden de resultaten der complementbindingsreactie met antigenen der zuurvaste bacillen en met Bordet-Wassermann's antigeen vergeleken, voorzien van 'n theoretische beschouwing.

Conclusie.

1. De patiënt Sidik leed aan lepra type N₃ en kreeg later complicatie met t.b.c. in de linker nier en in de longen.
2. De infectie met t.b.c. is ook aangetoond bij de sectie, waarbij bleek, dat de linker nier, de lever en de longen zoowel macroscopisch als microscopisch tuberkels vertoonden.
3. Uit de longen der cavia, geënt met het longmateriaal van Sidik, werd een cultuur van zuurvaste bacillen geïsoleerd, die volgens de verdere caviaproeven uit t.b.c. bacillen bestaat.
4. Voordat de patiënt de compliceerende t.b.c. infectie kreeg, werd uit een bilabsces een cultuur van zuurvaste bacillen op Lubenau, Sauton en Kirchner voedingsbodem verkregen.
5. Deze cultuur is niet pathogeen voor cavia's, konijnen, witte rat, kippen en grijze aap (*Mac. Cynomolgus*), zoodat het heel onwaarschijnlijk is, dat zij uit t.b.c. bacillen bestaat; noch behooren de bacillen tot de saprophytische soorten.
6. De voor cavia's apathogene zuurvaste bacillen zijn virulent voor de zwarte aap (*Simnopathes maurus*) en voor een witte muis.
7. Het bouillon filtré van de bacillen werkt bij intracutane

injectie bij de leprozen sterker dan het antigeen van Mitsuda.

8. Bij kruis complementbindingsreactie blijkt, dat de stam Sidik uit het bilabsces dichtër met den leprabacil verwant is dan de t. b. c. bacillen (humane, bovine, aviaire type) en de saprophytische chromogene zuurvaste bacillen, zoodat het mede door de avirulentie voor caviae zeer waarschijnlijk is, dat deze stam een leprabacillencultuur is.
9. Het resultaat van de complementbindingsreactie is dat de alcoholische extracten der zuurvaste bacillen

76.4% $\pm 3,5$	positief reageeren v. 148 leprasera v. pat. type C
78.2% $\pm 4,7$	" " " " 78 " " " " CN
15.2% $\pm 3,3$	" " " " 138 " " " " N
10. Dezelfde reactie met runderhart-extract verricht geeft de volgende cijfers.

38.5%	positief bij type C van 148 sera
33.3%	" " " " CN " 78 "
20.3%	" " " " N " 138 "
11. Het is verder aangetoond, dat in de leprasera, zoowel de specifieke reaginen, als de in labiele toestand verkeerende globulinen, welke de onspecifieke labiliteitsreactie teweeg brengen, naast elkaar kunnen voorkomen.

Ten slotte zijn wij aan de onderstaande dames en heeren, die ons bij het verrichten van bovenvermelden arbeid behulpzaam zijn geweest, ten zeerste verplicht: Mej. Dr. E. A. van Teutum, Mej. Dr. Ch. Flaumenhaft, Dr. R. Boenteran Martoatmodjo, Achmad Darwis, Prof. Dr. J. E. Dinger, Abdul Gafar, R. H. Hadi-koesoemo, Prof. Dr. F. L. Huber, Dr. G. A. van der Horst, J. F. Malaihollo, Dr. J. A. de Nooy, R. M. Notokworo, G. H. Rehatta, J. B. Sitanela, R. Soemakno, R. Soeparmo en J. Terpstra.

Summary.

In August 1932 a strain of acidfast bacilli on Lubenau, Sauton and Kirchner culture media was obtained from an abscessus in the buttock of patient Sidik, suffering from leprosy N₃, with acidfast bacilli in the nasal mucosa. The culture which was nonpathogenic for guinea pig, rabbit, fowl, white rat and

grey monkey (*mac. cynomolgus*), only causing a local abscessus, proved pathogenic for the black monkey (*Semnopithecus maurus*) and for the mouse. The black monkey contracted lobar pneumonia caused by these bacilli when injected submucously in the nose; inoculated subcutaneously in the abdomen the monkey showed caseous lymphatic glands on either side of the spinal column.

In December 1932 patient Sidik showed lung symptoms reminding of tuberculosis. The sputum contained acidfast bacilli which were non-pathogenic for caviae.

In April 1933 the patient had hematuria containing acidfast bacilli which were virulent for caviae.

The patient died in December 1933 with tuberculous lesions in the lung, the kidney and in the liver.

When the lung juice was inoculated in a guinea pig, this animal became sick and died, showing tuberculosis in the lung and liver, the spleen was distinctly enlarged, weighing 34.55 gr, the surface is smooth and glacy. A strain of acidfast bacilli was cultured from the lung of this guinea pig.

The allergic test with the filtrate of the broth culture of the strain Sidik from the buttock abscessus shows a severer reaction than the Mitsuda test.

The antigenic property (complement fixation) of the alcoholic extract from the bacilli-Sidik with rabbit immune sera is more closely related to that of the lepra-bacilli, than that of the t. b. c. bacilli is to the latter.

With human leprosy sera on the contrary, there is no difference in the antigenic property between the extract from the strain Sidik and extracts from the t. b. c. bacilli (*mammalian*, *avium*).

The result of the complement fixation test with the acidfast bacilli antigen is:

Lepor	C	148, of which	113	(76.4%) +;	5	(3.4%) ±;	30	(20.2%) —
"	CN	78, " "	61	(78.2%) +;	2	(2.5%) ±;	15	(19.3%) —
"	N	133, " "	21	(15.2%) +;	6	(4.3%) ±;	11	(80.5%) —

Control-sera:

(B.-Wt.)—	318, of which	1 (week) +;	1	±;	313	(97.8%) —	5 antic.
(B.-Wt.)—	184, " "	19	(10.3%) +;	2	(1.1%) ±;	149	(81 %) — 14 antic.

t. b. c.-sera:

(B.-Wt.)—	78, " "	8	(10.3%) +;	1	(1.3%) ±;	69	(88.5%) —;
(B.-Wt.)—	31, " "	7	(22.3%) +;	1	(3.2%) ±;	18	(88.5%) — 5 antic.

The result of the Bordet-Wassermann test is:

38.5%	positive out of 148 sera type	C.
33.3%	„ „ „ 78 „ „	CN.
20.3%	„ „ „ 138 „ „	N.

Our research by means of the complement fixation test at 37° and at 0°, indicated that some of the leprosy sera contain the specific antibody (reagin) as well as the globulin causing the nonspecific reaction.

We also have two strains of acidfast bacilli from the patient Sidik. There is a distinct difference between these two cultures; the first-one is nonpathogenic for guinea-pigs and on account of its antigenic property, is likely a culture of *Mycobacterium leprae*; the second one, pathogenic for guinea-pigs, is a strain of *t. b. c.* bacilli.

GERAADPLEEGDE LITERATUUR.

- Mej. J. C. H. Broek: Les granules du virus tuberculeux aviaire. (Diss.)
 C. Bruck: Serodiagnose der Syphilis.
 A. Calmette: L'infection bacillaire et la tuberculose.
 Prof. Dr. J. Jadassohn: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen (Kolle, Wassermann).
 V. Klingmüller: Die Lepra.
 Prof. Dr. K. Landsteiner: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen (Kolle, Wassermann).
 Prof. Dr. K. Laubenheimer: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen (Kolle, Wassermann).
 E. Leuret et Caussimon: Les Réactions du Tissu Pulmonaire dans la Tuberculose.
 Prof. Dr. H. Sachs: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen (Kolle, Wassermann).
 Akerberg, Almkvist en Jundell: Lepra IX. 1910, pag. 7—9.
 Azua en Covisa: Lepra IX. 1910, 143.
 Babes en Busila: Zbl. Bakt. Ref. Bd. 47, 1910, 743.
 Baermann en Wetter: Munch. Med. W. 1910, 2131.
 Bergman, Sitanala en Sardjito: Med. D. V. G. 1933, 189.
 Biehler en Eliasberg: Lepra IX. 1910, 207.
 Blumenthal: Zbl. Bakt. O. Bd. 122, 1931, 62.
 Bruck en Gressner: Lepra IX. 1910, 52.
 Buchler en Eliasberg: Lepra IX. 1910, 207.
 Clegg: Lepra IX. 1910, 125.
 Dinger: G. T. N. I. 1935, 347.
 Eddy: Int. J. Leprosy. 1937, 31.

- Eitner: Lepra VIII. 1909, 113.
Ehlers en Bourret: Lepra XI. 1910, 368.
Essed: G. T. N. I. 1936, 3135.
Esseveld: G. T. N. I. 1937, 865.
Gaucher en Abrami: Lepra VIII. 1909, 152.
Groh: Zbl. Bakt. O. Bd. 128, 1933, 353..
Hayashi: Leprosy Rev. IV. 1933, 159.
Houtum: G. T. N. I. 1906, 159.
Jundell, Almkvist en Sandmann: Lepra VIII. 1909, 236.
Kolmer en Denney: Arch. of Der. 1923, 62.
Lampe: G. T. N. I. 1928, 994.
Lampe en de Moor: G. T. N. I. 1936, 3147.
Lominski: Zbl. Bakt. O. Bd. 128, 1933, 276.
Marchoux en Bourret, Lepra VIII. 1909, 123.
Pattiradjawane: Medische Berichten. 1937, 3.
Recio: Lepra IX. 1910, 179.
Reenstierna: An. Inst. Pasteur. 1926, 78.
Van Riemsdijk: Zbl. Bakt. O. Bd. 128, 1933, 503.
Van Riemsdijk: Zbl. Bakt. O. Bd. 130, 1933, 247.
Ryrie: Int. J. of Leprosy. 1934, 77.
Schlossmann: Zbl. Bakt. O. Bd. 115. 1929, 474.
Serra: Lepra IX. 1910, 219.
Shiga: Zbl. Bakt. O. Bd. 114. 1929, 511.
Slatineanu en Danielopulo: Lepra VIII. 1909, 233.
Soule: Int. J. of Leprosy. 1935, 181.
Sugai: Lepra VIII. 1909, 157.
Valtis en van Deinse: Antonie van Leeuwenhoek. 1934, 27.
Witebsky, Klingenstein en Kuhn: Zbl. Bakt. Bd. 122, 1931, 65.
-

Boekaankondiging.

Het Chemisme der ademhaling, door K. L. van Schouwenburg en E. G. Wassink. Tweede omgewerkte uitgave van een overzicht, samengesteld door A. J. Kluyver. Amsterdam, D. B. Centen's Uitgeversmij. N.V., 1937, 61 blz.

Uit het voorbericht van Prof. Kluyver blijkt, dat het boekje zijn ontstaan te danken heeft aan het feit, dat hij te Utrecht een reeks voordrachten over het in de titel genoemde onderwerp heeft gehouden, die, in het Chemisch Weekblad gepubliceerd, in wijdere kring bekend zijn geworden. Waar er blijkbaar in den lande grotere belangstelling voor dit onderwerp bestond, heeft hij zijn leerlingen, Dr. Wassink en Ir. van Schouwenburg, bereid gevonden het door hem destijds medegedeelde in boekvorm te gieten. Zij zijn daarin, naar het ons voorkomt op gelukkige wijze geslaagd.

Voor lezers van ons tijdschrift zal het wel niet nodig zijn een bijzondere aanbeveling voor dit inderdaad zeer lezenswaardige opstel, over een hoogst interessant onderwerp en afkomstig uit een op dit gebied bekende leerschool, te schrijven. Wij menen, dat wij er mede kunnen volstaan hun aandacht erop te vestigen, dat het prettig geschreven en duidelijk geredigeerd boekje is verschenen. Wij wensen het van ganser harte een volledig succes toe.

de G.

INHOUD - Deel 4.

W. DE BOER, Ir. H. L. BOOGAERT. Ir. L. N. S. HOMANS en Ir. W. C. Smit, In hoeverre kan de duurzaamheid van Koelhuisbater worden beïnvloed door verschillende wijzen van het zuren van den room en door het al of niet zouten van de bater	1
Dr. H. W. DE BOER en O. BOSGRA, Onderzoekingen betreffende de schadelijkheid van minerale olie als plaatolie	147
W. A. COLLIER en M. J. VERHOOG, Het p-aminobenzolsulfamide als resistentie-beïnvloedende „Wirkstoff”	215
Dr. L. E. DEN DOOREN DE JONG, De gedragingen van Azotobacter onder normale voedingscondities en radiumbestraling	203
Dr. T. FOLPMERS, Verslag van de vergadering der Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie	173
Dr. JAC. JANSEN, Over enkele enzoëtiën veroorzaakt door S. typhi murium	286
F. LIEBERT and L. KAPER, Some notes on the influence of light on coloured coli-media	164
J. J. VAN LOGHEM, Over bacterie-verandering als normale en ziekelijke functie	113
Dr. A. W. POT, De regeneratie van zoogenaamde „gaslooze” paratyphusstammen in calcium-formiaat-peptonwater	212
Dr. A. W. POT, Heeft de indeeling van de Flexnergroep der dysenteriebacillen volgens Andrewes en Inman epidemiologische betekenis?	279
Dr. A. RUYS, Veranderlijkheid van tuberkel-bacillen van het bovine-type	179
Dr. M. SARDJITO, Dr. A. MOCHTAR en R. WIRASMO, Een onderzoek van het water Rawa-Pening als badwater in verband met eventuele typhus, dysenterie en leptospirosis infectie	53
Dr. SARDJITO en Dr. A. MOCHTAR, Een poging tot het cultiveeren van lepra-bacillen	222, 294
Dr. R. Th. SCHOLTENS, De smooth-roughvariatie van de Typhusbacterie	126
Dr. A. TASMAN en Dr. A. C. BRANDWIJK, Stofwisselingsproeven met C. Diphtheriae. II	187
Dr. J. W. DE WAAL, Eischen voor de samenstelling van consumptiemelk	261
Dr. Ir. A. Ph. WEBER, Dr. es Sc., L’Influence des hormones cristallisées sur la croissance de certaines espèces de levures	79
BOEKAANKONDIGING	110, 331
PROFESSOR Dr. D. A. DE JONG-STICHTING	259, 260

ANTONIE VAN LEEUWENHOEK

NEDERLANDSCH TIJDSCHRIFT VOOR HYGIËNE,
MICROBIOLOGIE EN SEROLOGIE

verschijnt driemaandelijksch.

PRIJS PER JAARGANG fl. 8.50.

Men abonneere zich door den Boekhandel of bij de Uitgevers

N.V. SWETS & ZEITLINGER, Boekhandel en Uitgevers Maatschappij Keizersgracht 471, AMSTERDAM

Alle stukken, de redactie betreffende, zijn te richten aan Prof. Dr. W. C. DE
GRAAFF, Prins Hendriklaan 73, UTRECHT.

Den schrijvers wordt verzocht hun manuscripten geheel persklaar, zooveel
mogelijk in machineschrift geschreven, in te zenden.

Mededeelingen aangaande advertenties, verzending, adresverandering en
dgl. aan de Uitgevers.
